ORGANISATION MENSCHLICHER IMMUNGLOBULINGENE

ISOLIERUNG UND ANALYSE VON REGIONEN DES MENSCHLICHEN V_K-LOCUS DURCH COSMIDKLONIERUNG

HANS-DIETER POHLENZ

1986

Organisation menschlicher Immunglobulingene
Isolierung und Analyse von Regionen des menschlichen V_K-Locus durch Cosmidklonierung

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Hans-Dieter Pohlenz
aus Filderstadt

München 1986

vorgelegt am 12. Juni 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Zachau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning-Honegger

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1986

Meiner Mutter in herzlicher
Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Oktober 1982 bis November 1985 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit, seine Anleitung und Unterstützung.
Allen Kollegen, besonders Herrn Dr. Dr. M. Pech, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

M. Pech, H.-R. Jaenichen, H.-D. Pohlenz, P.S. Neumaier, H.G. Klobeck und H.G. Zachau, J. Mol. Biol. **176**, 189-204 (1984)

M. Pech, H. Smola, H.-D. Pohlenz, B. Straubinger, R. Gerl und H.G. Zachau, J. Mol. Biol. **183**, 291-298 (1985)

H.G. Klobeck, G.W. Bornkamm, G. Combriato, R. Mocikat, H.-D. Pohlenz und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. **13**, 6514-6526 (1985)

E. Lötscher, K.-H. Grzeschik, H.G. Bauer, H.-D. Pohlenz, B. Straubinger und H.G. Zachau, Nature **320**, 456-458 (1986)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547928_0007

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung.....1

2. Ergebnisse.....5

2.1. Etablierung von Cosmidgenbanken aus menschlicher-DNA...5

2.1.1. Konstruktionsprinzip.....8

2.1.2. Präparation von genomischen Restriktionsfragmenten für die Cosmidklonierung.....10

2.1.3. Kontrollversuche zur Vermeidung von Ligierungs-artefakten und Rekombinationen.....12

2.1.4. Faktoren, die die Ausbeute an rekombinanten Cosmidklonen beeinflussen.....13

2.1.5. Übersicht über die analysierten Cosmidgenbanken.....15

2.2. Isolierung von Cosmidklonen aus Genbanken.....17

2.2.1. Optimierung der Bedingungen für die Koloniefilter-hybridisierung.....17

2.2.2. Isolierung von Cosmidklonen mit subgruppenspezifischen Suchklonen; erste Charakterisierung der erhaltenen Isolate.....19

2.2.3. Qualität der verwendeten Cosmidgenbanken und Cosmidisolierungen.....26

2.3. Kartierung ausgewählter Cosmidklone mit Restriktions-nukleasen.....29

2.3.1. Charakterisierung von Cosmidklonen der W-Region.....34

2.3.2. Charakterisierung von Cosmidklonen der O-Region.....38

2.3.3. Charakterisierung von Cosmidklonen der Region Chr.1...40

2.3.4. Charakterisierung eines Cosmidklons, der ein V_K-Gensegment der Subgruppe IV enthält (B-Region).....43

2.3.5. Charakterisierung von Cosmidklonen der T-Region.....44

2.4. Extendierung der Regionen W und O mit spezifischen Suchklonen.....47

2.4.1. Konstruktion von Extensionssuchklonen der W-Region....50

2.4.2. Isolierung und erste Analyse von Cosmidklonen, die die W-Region extendieren.....53

2.4.3. Kartierung von extendierenden Cosmidklonen der W-Region.....57

2.4.4. Konstruktion von Extensionssuchklonen der O-Region....61

2.4.5. Isolierung von extendierenden Cosmidklonen der O-Region.....64

2.4.6. Restriktionskartierung von Cosmidklonen, die die O-Region extendieren.....65

2.5. Eingehende Analyse der W-Region.....69

2.5.1. 5'-3' Polarität von V_K-Gensegmenten innerhalb der W-Region.....69

2.5.2. Die strukturellen Unterschiede der Subregionen Wa und Wb können auf ein Duplikationsereignis während der Evolution zurückgeführt werden.....73

2.6. Nähere Charakterisierung von Strukturen, die bei der 5'-Extension der O-Region erhalten wurden.....76

3. Diskussion.....80

3.1. Kartierung des menschlichen V_K-Locus durch Analyse rekombinanter Cosmidklone.....80

3.2. Zuverlässigkeit von strukturellen Daten, die über rekombinante Cosmidklone erhalten wurden.....83

3.3. Abstand und Orientierung von V-Gensegmenten.....85

3.4. Duplikationen innerhalb des V_K-Locus.....88

3.5. Anordnung von V-Gensegmenten unterschiedlicher Subgruppen innerhalb des menschlichen V_K-Locus.....90

3.6. Liefern die bisher isolierten Cosmidklone ein repräsentatives Bild des menschlichen V_K-Locus?.....92

4. Materialien und Methoden.....97

4.1. Materialien.....97

4.1.1. Chemikalien, Enzyme und Nährmedien.....97

4.1.2. Bakterienstämme, Cosmidvektoren, Plasmidvektoren, Human-DNA's.....98

4.1.2. Menschliche V_K-Proben.....99

4.2. Methoden.....100

4.2.1. Konstruktion der Cosmidgenbanken IIIa,b,c.....100

4.2.1.1. Erzeugung von phosphatasebehandelten Partialspaltungsfragmenten aus Plazenta-DNA mit der Restriktionsnuklease Sau 3A.....100

4.2.1.2. Herstellung von Vektorarmen.....101

4.2.1.3. Präparation von Extrakten für die in vitro Verpackung von Cosmid-DNA.....102

4.2.1.4. Ligierung und in vitro Verpackung von Vektor- und Donor-DNA.....104

4.2.1.5. Transfektionen.....105

4.2.1.6. Analyse von Cosmidgenbanken durch Koloniefilter-hybridisierung bei hoher Koloniedichte.....105

4.2.2. Präparation von DNA.....106

4.2.2.1. Präparation von DNA aus Plasmid- und Cosmidklonen....106

4.2.2.2. DNA-Präparation aus rekombinanten M13-Phagenklonen...107

4.2.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen; Gelelektrophoresen.....107

4.2.4. Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Gelen.....108

4.2.5. DNA-Transfer auf Nitrozellulosefilter und Hybridisierung.....108

4.2.6. Radioaktive Markierung von DNA.....109

4.2.7. Subklonierung isolierter Restriktionsfragmente in pBR 322.....109

4.2.8. Subklonierung isolierter DNA-Fragmente in M13 mp7, mp8, mp10 und mp18.....110

4.2.9. Linker-Addition.....110

4.3. Biologische Sicherheit.....111

5. Zusammenfassung.....112

6. Literaturverzeichnis.....115

7. Abkürzungen und Erklärungen.....121

Lebenslauf

1. Einleitung und Problemstellung

Antikörper spielen eine zentrale Rolle im Immunsystem von Wirbeltieren. Sie sind in der Lage eine praktisch unbegrenzte Zahl potentieller Antigene zu erkennen und zu binden. Die herausragende Eigenschaft von Antikörpern oder Immunglobulinen ist also ihre strukturelle Variabilität. Es gibt Schätzungen, nach denen das Repertoire eines Organismus 10^6-10^8 verschiedene Antikörpermoleküle umfaßt (1). Durch proteinchemische und molekularbiologische Untersuchungen ist es in den zurückliegenden zwanzig Jahren gelungen, die Struktur der Immunglobuline zu ermitteln, sowie Einblicke in die Mechanismen der Antikörperbildung zu erhalten (2).
Antikörper bestehen aus zwei leichten (L) und zwei schweren (H) Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (3,4). Durch Sequenzanalyse von Immunglobulinen konnte gezeigt werden, daß sowohl die schweren, als auch die leichten Ketten aus variablen (V) und konstanten (C) Regionen aufgebaut sind (5, 6). Die Aminosäuren der variablen Bereiche bilden die Antigenbindungsstelle der Immunglobuline.
Die Frage, wie die genetische Information für die große Zahl verschiedener, aber dennoch verwandter Proteine genetisch realisiert wird, war lange Zeit Gegenstand konkurrierender Theorien. Erst durch die in den vergangenen Jahren entwickelten Methoden der Gentechnologie konnte gezeigt werden, daß funktionelle Immunglobuline durch somatische Rekombination einzelner Gensegmente in den Antikörper produzierenden B-Lymphozyten erzeugt werden (7, 8, 9).
Nach der Verknüpfung von V- und C-Gensegmenten entstehen die funktionellen Gene für die schwere und die leichte Kette eines Antikörpers. In der Keimbahn-DNA und in der DNA von nichtlymphoiden Zellen sind diese Gensegmente durch einen DNA-Bereich unbekannter Länge voneinander getrennt. Im Verlauf der Umlagerung wird ein V-Gensegment über ein J-Segment verbunden (10). Bei der Bildung einer funktionellen schweren Kette kommen noch D- und N-Gensegmente hinzu (11, 12).

Drei Multigenfamilien, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, codieren für die Gensegmente der schweren Kette und der leichten Ketten des K- und λ-Typs (13). Die Anzahl und Organisation der Gensegmente ist von Art zu Art verschieden.

Grundsätzlich können also zwei Faktoren unterschieden werden, die zur Entstehung der Antikörperdiversität beitragen:
1. Eine genetisch fixierte Anzahl verschiedener Gensegmente in der Keimbahn
2. Somatische Prozesse während der Differenzierung der B-Lymphozyten
Innerhalb der somatischen Prozesse können mehrere Mechanismen unterschieden werden, die zur Diversifizierung der Immunglobuline beitragen. Durch die Möglichkeit der Verknüpfung unterschiedlicher V-Gensegmente mit verschiedenen J- bzw. D-Segmenten wird ein hohes Maß an Variabilität erzeugt (kombinatorische Diversifizierung). Allerdings konnte gezeigt werden, daß die Kombination von V- und C-Gensegmenten nicht völlig statistisch erfolgt. Im L_λ-System der Maus werden bestimmte VJ-Kombinationen bevorzugt benutzt (14). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß die J_K-Gensegmente der Maus mit unterschiedlicher Häufigkeit verwendet werden (15).
Ein weiterer Mechanismus der somatischen Diversifizierung ist dadurch gegeben, daß die Verknüpfung von V- und C-Gensegmenten in unterschiedlichen Rastern erfolgen kann (16, 17). Schließlich wird die Vielfalt der Antikörper noch entscheidend durch somatische Mutationen vergrößert, die inzwischen durch Sequenzvergleiche von Keimbahn V-Gensegmenten mit ihren umgelagerten Äquivalenten in einer größeren Zahl von Fällen nachgewiesen werden konnten (1, 13).
Eine genaue Beantwortung der Frage, welchen Beitrag somatische Prozesse zur Diversifizierung der Antikörper leisten und welcher Anteil durch die genetisch festgelegte Zahl unterschiedlicher Gensegmente im Keimbahngenom geliefert wird, ist auf dem derzeitigen Erkenntnisstand nicht möglich. Den Beitrag somatischer Mutationen zur Entstehung des Antikörperrepertoires quantitativ zu erfassen, dürfte schwierig sein. Die zweite, derzeit weitgehend unbekannte Größe, die bei Überlegungen dieser Art berück-

sichtigt werden muß, ist die Anzahl der Gensegmente in der Keimbahn: Während die strukturelle Organisation von J-, D- und C-Gensegmenten für leichte und schwere Ketten bei Mensch und Maus inzwischen gut untersucht ist, liegen über die Anzahl und Organisation der V-Gensegmente bisher vergleichsweise wenig Daten vor. Alle bisherigen Schätzungen, die das Keimbahnrepertoire an V-Gensegmenten betreffen, beruhen auf indirekten Methoden (13). Für den V_K-Locus der Maus wurde aufgrund von Lösungshybridisierungen eine Zahl von ca. 2000 V_K-Gensegmenten postuliert (18). Andererseits legen Versuche, diese Zahl durch Blothybridisierungen zu ermitteln, die Existenz von 90-320 V_K-Gensegmenten nahe (19).
Für eine quantitative Analyse des Beitrags der V-Gensegmente zur Entstehung der Antikörperdiversität sind die bisherigen Daten zu unpräzise. Darüber hinaus kann die Zahl von funktionellen V-Gensegmenten nicht durch einfache Hybridisierungsversuche ermittelt werden, da ein hoher Anteil an Pseudogenen unter den bisher durch DNA-Sequenzanalyse untersuchten V_H- V_K- und V_λ-Gensegmenten nachgewiesen werden konnte (20, 21, 22).

Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, die Organisation der V-Gensegmente in der Keimbahnanordnung durch Anwendung molekularer Klonierungstechniken zu untersuchen. Der menschliche V_K-Locus, der Gegenstand dieser Arbeit ist, erscheint hierfür besonders geeignet. Aufgrund der Aminosäuresequenzen von über 150 K-Myelomproteinen können die menschlichen K-Ketten, die 70% der L-Ketten im Humanserum ausmachen (23), in vier distinkte Subgruppen (V_KI-V_KIV) eingeteilt werden (24, 25, 26). Im Gegensatz dazu muß für das Maus-System die Existenz von über 30 Subgruppen gefordert werden (27). Diese Heterogenität würde die Isolierung aller Maus V_K-Gensegmente über Hybridisierungstechniken erschweren. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, daß auch die Gesamtzahl an Maus V_K-Gensegmenten deutlich höher ist als beim Menschen (28).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, möglichst große Teile des menschlichen V_K-Locus zu klonieren und allgemeine Organisationsprinzipien durch die genauere Analyse einzelner Regionen zu ermitteln. Vor Beginn dieser Dissertation war es innerhalb der Ar-

beitsgruppe bereits gelungen, menschliche V_K-Gensegmente aus einer Phagenbank (29) zu isolieren (20). Um größere Bereiche des V_K-Locus zu charakterisieren, wurden anschließend zwei menschliche Cosmidgenbanken (20, 30) analysiert. Die überwiegende Zahl der erhaltenen Cosmidklone entsprach jedoch nicht den Erwartungen: Aufgrund erheblicher, konstruktionsmethodisch bedingter Mängel, war es nicht möglich, aus den Restriktionskarten der erhaltenen Cosmidklone die Struktur größerer genomischer Regionen zu ermitteln (20).
Aus dieser Situation ergab sich der logische Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Zunächst war es erforderlich Cosmidgenbanken guter Qualität unter Verwendung eines verbesserten Konstruktionsprinzips zu etablieren, aus denen dann mit menschlichen V_K-Proben verschiedener Subgruppen rekombinante Cosmide isoliert werden sollten. Darüber hinaus war geplant, einige der erhaltenen Strukturen durch die Technik des "chromosomal walkings" zu extendieren.

Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten können Aussagen über den Abstand und die gegenseitige Orientierung der V_K-Gensegmente getroffen werden. Im Zusammenhang mit der Evolution der Multigenfamilie ist die Anordnung der Gensegmente unterschiedlicher Subgruppen innerhalb des V_K-Locus interessant. Durch Hybridisierungsversuche mit den DNA's verschiedener menschlicher Individuen konnte nachgewiesen werden, daß größere Bereiche innerhalb des V_K-Locus dupliziert worden sind. Die Anzahl der, über den beschriebenen experimentellen Ansatz isolierten V_K-Gensegmente, wird im Zusammenhang mit der Repräsentativität der verwendeten Genbanken sowie der Qualität der Cosmidisolierungsversuche diskutiert und mit bisher verfügbaren Daten verglichen.

2. Ergebnisse

Die Beschreibung der Versuche im Ergebnisteil folgt weitgehend dem zeitlichen Verlauf der Arbeit. Zunächst wird die Konstruktion von Cosmidgenbanken aus menschlicher Plazenta-DNA (Individuum St) beschrieben. In Kapitel 2.1.5 (Tabelle 2) sind diese Genbanken übersichtlich dargestellt. Anschließend werden Experimente zur Isolierung und Charakterisierung von Cosmidklonen dargestellt (Kapitel 2.2 und Kapitel 2.3). Die Extension zweier Regionen des V_K-Locus (Region O und Region W) wird in Kapitel 2.4 abgehandelt. Im letzten Abschnitt (Kapitel 2.5 und 2.6) erfolgt die Darstellung von Versuchen zur eingehenderen Charakterisierung der beiden Regionen.
Im Methodenteil (Kapitel 4.1.2) wird eine Übersicht über alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten V_K-Proben gegeben. Die Nomenklatur für die Cosmid-, Plasmid-, und Phagenklone wird am Schluß der Arbeit (Abkürzungen und Erläuterungen) erklärt.

2.1. Etablierung von Cosmidgenbanken aus menschlicher DNA

Cosmide sind als Vektoren für die Konstruktion von Genbanken aus genomischer DNA eukaryontischer Organismen entwickelt worden (31, 32). Mit Hilfe des Cosmidsystems ist es möglich, Restriktionsfragmente in der Größenordnung von 35-47 kb autonom in E. coli zu vermehren. Ein typischer Cosmidvektor besitzt neben einem Replikationsursprung, der im allgemeinen vom Plasmid Col El abgeleitet ist, einen Selektionsmarker, sowie die cos-Region des Bakteriophagenλ.
Cosmide vereinigen also die Merkmale der beiden alternativen Klonierungssysteme: Plasmide und Vektoren, die vom Bakteriophagenλ abgeleitet sind. In einem typischen Ligierungsansatz werden trimere oder oligomere Konstrukte erzeugt, in denen die genomischen Restriktionsfragmente vom Cosmidvektor flankiert werden. Damit

wird es möglich, rekombinante Cosmide deren cos-Stellen 38-53 kb voneinander entfernt sind, in vitro in leere Phagenhüllen zu verpacken und mit hoher Effizienz in die E. coli Wirtszelle einzubringen (33, 34). Dies stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber dem Plasmidsystem dar, da die Transformation von E. coli Zellen mit Plasmiden dieser Größe ein außerordentlich ineffizienter Vorgang ist (35).

Bei Vektoren, die vom Bakteriophagen λ abgeleitet sind, besteht eine Größenbeschränkung hinsichtlich der inserierbaren genomischen Restriktionsfragmente, die bei etwa 24 kb liegt, da die Anteile der Vektor-DNA, welche für die lytische Vermehrung des Phagen verantwortlich sind sowie die Strukturgene für Capsid und Schwanzfasern, nicht durch Fremd-DNA ersetzbar sind. Aufgrund der Größenselektion bei der Verpackung darf die Länge der rekombinanten Konstrukte 53 kb nicht überschreiten.
Cosmide bieten sich daher als Vektoren für die Etablierung von Genbanken komplexer eukaryontischer Genome wie dem des Menschen ($3x10^9$ bp pro haploides Genom) an. Bei der Analyse von Multigenfamilien bieten sie, vermöge ihrer Größe, zudem die Chance mehrere Mitglieder der Familie auf einem rekombinanten Molekül zu isolieren.
Trotz dieser offensichtlichen Vorteile bestand lange Zeit eine gewisse Zurückhaltung gegenüber der Anwendung von Cosmiden als Vektoren bei der physikalischen Charakterisierung ausgedehnter genetischer Loci. Diese Skepsis war vor allem auf das gehäufte Auftreten konstruktionsmethodisch bedingter Mängel in Cosmidgenbanken aus der Anfangszeit der Cosmidklonierung zurückzuführen (20). Bei der Wahl einfacher Cosmidklonierungsstrategien (z.B. Ligierung von linearisierter Cosmid-DNA an unfraktionierte Partialverdau-Fragmentgemische aus genomischer DNA) zeigt ein hoher Anteil der isolierten Cosmidklone folgende Ligierungsartefakte: Integration von Vektoroligomeren, Verknüpfung von mehreren Vektorkopien mit mehreren Donor DNA-Fragmenten, Verknüpfung von Donor DNA-Fragmenten, die im Genom nicht kontinuierlich angeordnet sind.

In der Folgezeit sind verbesserte Strategien für die Cosmidklonierung entwickelt worden, die das Auftreten unerwünschter Ligierungsprodukte verhindern sollen. Von Grosveld et al. (36) wird die Behandlung der linearisierten Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase sowie eine Größenfraktionierung der genomischen Partialverdaufragmente vorgeschlagen. Für die Konstruktion der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Genbanken wurde gemäß Zitat (37) alkalische Phosphatase zusammen mit einer Kombination von Restriktionsenzymen verwendet, um Cosmidklone zu erhalten, deren Restriktionskarten kolinear mit der untersuchten genetischen Region sind (vgl. 2.1.1.).

Ein weiterer Gesichtspunkt, der vor der Etablierung von Genbanken bedacht werden muß, betrifft die Stabilität der in vitro generierten rekombinanten DNA-Moleküle im Wirtsstamm E. coli. Für die Propagation von menschlichen genomischen DNA-Fragmenten in Bakteriophage-λ-Vektoren konnte nachgewiesen werden, daß 8,9% dieser Sequenzen nicht stabil in E. coli rec^+-Wirtsstämmen, die üblicherweise zur Phagenklonierung verwendet werden, vermehrt werden können (38). Es wurde beobachtet, daß invertierte Sequenzrepetitionen in Stämmen des Phänotyps rec^+ eliminiert werden (39). Ähnliche Phänomene sind für in tandem-repetierte Sequenzen beschrieben (40). Rekombinante Cosmide werden daher in rec A^--Wirtsstämmen vermehrt. Hier treten die für rec^+-Stämme beschriebenen Instabilitäten in einer vernachlässigbar niedrigen Frequenz auf (36, 37). In dieser Arbeit wurde der Wirtsstamm E. coli 490A verwendet, dessen $recA^-$-Phänotyp durch den in 2.1.3. beschriebenen Kontrollversuch überprüft wurde.
Durch die Anwendung verbesserter Klonierungsstrategien und die Wahl geeigneter Wirtsstämme ist es in den letzten Jahren gelungen, die Cosmidklonierung erfolgreich zur Strukturanalyse einer Vielzahl genetischer Systeme zu verwenden (z.B. 41-44).

2.1.1. Konstruktionsprinzip

Bei der Konstruktion der Cosmidbanken IIIa,b,c wurden größenfraktionierte, phosphatasebehandelte Restriktionsfragmente, die über eine partielle Spaltung von Plazenta-DNA (Individuum St) mit der Restriktionsnuklease Sau 3A erzeugt worden waren, nach dem generellen Prinzip von Ish-Horowicz und Burke (37) in die Bam HI-Stelle des Cosmidvektors pHC 79 inseriert. Sau 3A ist eine Restriktionsnuklease mit tetramerer Erkennungssequenz, die dieselben kohäsiven Enden erzeugt wie Bam HI. Eine Übersicht über die Einzelschritte wird in Abbildung 1 gegeben.

Zunächst wurden in getrennten Ansätzen unter Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (Bst EII und Cla I) lineare Vektormoleküle erzeugt, deren 5'-Phosphatenden mit alkalischer Phosphatase entfernt wurden. Durch Nachspaltung mit Bam HI wurde dann die Klonierungsstelle freigelegt. Bei quantitativem Verlauf aller Reaktionsschritte (vgl. Kontrollversuche: 2.1.3.) wird so eine Oligomerisierung von Vektormolekülen im Ligierungsansatz verhindert. Die anschließende Isolierung der entstandenen Vektorfragmente, die die cos-Region enthalten, ist nicht zwingend erforderlich (37), wurde jedoch im Interesse der Ausbeutesteigerung an rekombinanten Cosmidklonen durchgeführt (vgl.2.1.4.). Gleiches gilt für die Größenfraktionierung der phosphatasebehandelten genomischen Restriktionsfragmente (v.g.l. 2.1.2.).
Für Teile der Genbanken IIIb und IIIc wurde der Cosmidvektor pJB 8 verwendet. Die Präparation der Vektorarme erfolgte wie in Zitat (37) beschrieben. Das Plasmid pJB8 wurde von Ish-Horowicz und Burke (37) durch Einfügen eines synthetischen Bam HI-Linkers in die Eco RI-Stelle des Cosmidvektors Homer I (45) konstruiert. Durch die unmittelbare Nachbarschaft der Eco RI-Stelle und der Klonierungsstelle (Bam HI) ist eine vollständige Abtrennung der Vektor-DNA von der inserierten DNA bei der Konstruktion von Extensionssuchklonen möglich.

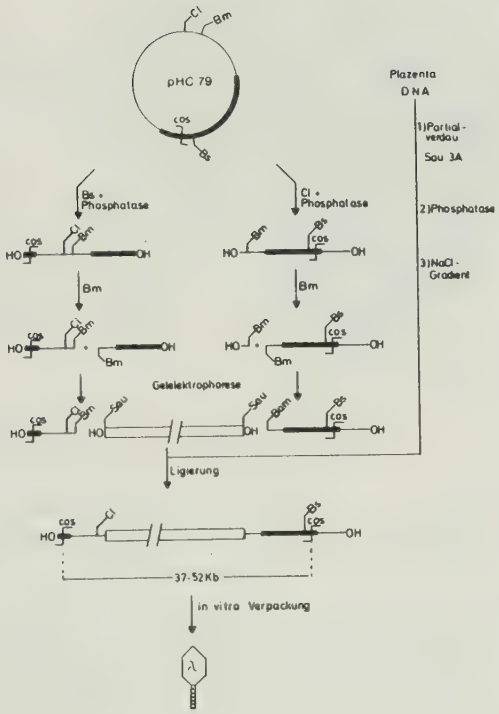


Abb.1 Konstruktionsschema: Klonierung von Sau 3A-Partialverdaufragmenten im Cosmidvektor pHC 79

(-OH=phosphatasebehandelte 5'-Enden; ▬=Anteile des Cosmidvektors, die vom Bakteriophagen-λ stammen; cos=terminale Region im linearen Phagengenom, die die cohäsiven Enden enthält; ——=Anteile des Cosmidvektors pHC 79, die aus dem Plasmid pBR 322 stammen.

2.1.2. Präparation von genomischen Restriktionsfragmenten für die Cosmidklonierung

Die Erfüllung der Forderung, daß jede beliebige Region eines Genoms mit gleicher Wahrscheinlichkeit in einer Genbank repräsentiert ist, hängt entscheidend von einer möglichst statistischen Fragmentierung der genomischen DNA ab. Dies wird üblicherweise durch partielle Spaltung der Donor-DNA mit einer Restriktionsnuklease erreicht. Hierbei erhalten Nukleasen, die eine tetramere Erkennungssequnz besitzen (statistische Spalthäufigkeit: alle 4^4=256 bp) den Vorzug vor Restriktionsenzymen mit hexamerer Erkennungssequenz. Da eukaryontische DNA's generell eine niedrigere Frequenz des Dinukleotids CpG aufweisen (46), sollte überdies die Verwendung von Restriktionsnukleasen mit CpG in der Erkennungssequenz vermieden werden.
In der vorliegenden Arbeit wurde das Restriktionsenzym Sau 3A verwendet, welches die genannten Grundforderungen erfüllt. Da die Spaltstellen für Restriktionsenzyme kinetisch nicht äquivalent sind und somit durch einen einzigen Partialverdau kein völlig statistisches Fragmentmuster zu erwarten ist, wurden die Einwirkzeiten der Nuklease Sau 3A bei konstanter DNA-Menge und konstanter Enzymmenge über einen möglichst weiten Bereich variiert. Das Ausmaß des endonukleolytischen Abbaus wurde jeweils gelelektrophoretisch analysiert (vgl. 4.2.1.1.). Kritisch für die Variationsbreite der Partialspaltungsbedingungen ist das Molekulargewicht der Ausgangs-DNA. Die verwendete genomische DNA sollte eine mittlere Größe von wenigstens 100 kb aufweisen. Die menschliche Plazenta-DNA Präparation lief gelelektrophoretisch bei deutlich höheren Molekulargewichten wie die als Referenz parallel aufgetragene DNA des Bakteriophagen T5 (106 kb) und stellte somit ein geeignetes Ausgangsmaterial für die Cosmidklonierung dar.

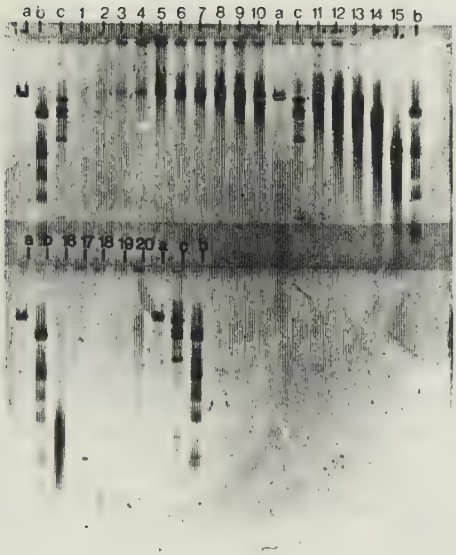


Abb.2 Anreicherung von Sau 3A-Partialverdaufragmenten im Größenbereich von 30-50 kb durch NaCl-Dichtegradienten-zentrifugation

Gezeigt ist die gelelektrophoretische Analyse eines Gradientenprofils (0,3% Agarosegel, vgl. 4.2.1.1.). In den Bahnen 1-20 wurden Aliquots aus jeder dritten Gradientenfraktion aufgetragen. Als Längenstandards wurden λ-DNA (a), mit Hind III behandelte λ-DNA (b) sowie ein Restriktionsverdau der Bakteriophagen T5-DNA mit Eco RI (c) verwendet. Die Fraktionen 9 -13 wurden vereinigt, ethanolgefällt und in einer Konzentration von 350µg/ml in 10mM Tris; pH 8,0; 1mM EDTA gelöst.

Durch Partialspaltungen werden überlappende Restriktionsfragmente erzeugt. Für die jeweils analysierte Region erhält man daher rekombinante Cosmidklone, deren Restriktionskarten sich überschneiden. Eine derartige Anordnung von Cosmiden eröffnet die Möglichkeit, die primär erhaltenen Regionen durch Analyse der Genbank mit geeigneten Suchklonen zu extendieren. Diese Technik wird im angelsächsischen Sprachgebrauch als "chromosomal walking" bezeichnet.

Nach der Partialspaltung der menschlichen Plazenta-DNA wurde das entstandene Fragmentgemisch mit alkalischer Phosphatase behandelt, um artifizielle Ligierungsprodukte aus genomischen Fragmenten zu vermeiden (37). Anschließend erfolgte eine Größenfraktionierung des Fragmentgemischs über eine kinetische Dichtegradientenzentrifugation in einem linearen NaCl-Gradienten. Hiermit wird eine Anreicherung von 30-50 kb großen Fragmenten erreicht. Dieser Schritt dient vor allem der Erhöhung der Ausbeute an rekombinanten Cosmidklonen, bezogen auf eine definierte Menge an Partialverdaufragmenten (vgl. 2.1.4.). In Abbildung 2 ist die gelelektrophoretische Analyse eines NaCl-Gradientenprofils gezeigt.

2.1.3. Kontrollversuche zur Vermeidung von Ligierungsartefakten und Rekombinationen

Im Interesse der Vermeidung von Ligierungsartefakten (Vektoroligomerisierung, Insertion von mehreren Vektorfragmenten zwischen genomische Fragmente, Ligierung von genomischen Fragmenten untereinander) ist es notwendig, alle Reaktionsschritte bei der Herstellung von Vektorarmen sowie die Phosphatasebehandlung der Donorfragmente quantitativ auszuführen. Daher wurde der Erfolg jedes Reaktionsschritts durch Kontrollversuche überprüft:

a) Quantitativer Verlauf der Vektorspaltungen
Die Komplettheit aller Restriktionsspaltungen der Vektor-DNA wurde durch gelelektrophoretische Analyse überprüft (Abwesenheit der Bande, die dem jeweiligen Ausgangsprodukt entspricht).
b) Quantitativer Verlauf der Dephosphorylierungsschritte
Der Erfolg der Phosphatasebehandlung von linearisierten Vektorfragmenten wurde durch Behandlung der am 5'-Ende dephosphorylierten DNA's mit T4 DNA-Ligase und anschließender gelelektrophoretischer Analyse überprüft. Dabei darf keine Bildung von Vektordimeren oder Oligomeren zu beobachten sein. Analoge Ligierungstests wurden für die dephosphorylierten genomischen Partialspaltungsfragmente durchgeführt. Nach Behandlung des

Gemischs mit T4 DNA-Ligase darf keine Veränderung des Fragmentkontinuums in Richtung höherer Molekulargewichte gegenüber der unbehandelten DNA zu beobachten sein (gelelektrophoretische Analyse in 0,3% Agarosegelen; vgl. 4.2.1.1.).
c) Ligierbarkeit der erzeugten Fragmentenden
Die Ligierbarkeit der Bam HI-Enden der Vektorarme sowie der Sau 3A-Enden vor der Phosphatasebehandlung wurde durch die oben beschriebenen Ligierungstests bewiesen.

Ein weiterer Kontrollversuch betraf die Überprüfung des $recA^-$-Phänotyps beim verwendeten Wirtsstamm E. coli 490A. Um die Abwesenheit phänotypischer Revertanten ($recA^+$) sicherzustellen, wurden mehrere Einzelkolonien über ein qualitatives Verfahren (47) vor jeder Transfektionsserie auf den Phänotyp $recA^-$ hin überprüft (relative UV-Sensitivität gegenüber dem rec^+-Kontrollstamm LE 392; vgl. 4.2.1.5.).

2.1.4. Faktoren, die die Ausbeute an rekombinanten Cosmidklonen beeinflussen

Bei der partiellen Spaltung von genomischer DNA und anschließender Größenfraktionierung werden nur ca. 8-10% des eingesetzten Ausgangsmaterials in Form von 30-50 kb großen Partialverdaufragmenten erhalten. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, daß eine hohe Ausbeute an Cosmidklonen bezogen auf eine definierte Menge an Donor DNA-Fragmenten wünschenswert ist, um den Verbrauch an Ausgangsmaterial in praktikablen Grenzen zu halten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Klonierungseffizienz (ausgedrückt in der Anzahl von Cosmidklonen/µg größenfraktionierter Donor-DNA-Fragmente) untersucht. Eine wesentliche Voraussetzung für ein effizientes Cosmidklonierungssystem ist die Präparation von Extrakten für die in vitro-Verpackung der rekombinanten Cosmid-DNA mit maximaler Qualität. Nach der in 4.2.1.3. beschriebenen Methode war es repro-

duzierbar möglich, Extrakte zu erhalten, die im Testsystem (Verpackung von DNA des Bakteriophagen λ , Wildtypgröße) $5x10^8$-$5x10^9$ pfu/µg λ-DNA lieferten. Hiermit war ein hocheffizienter Transfer der rekombinanten Cosmid-DNA in die Bakterienzelle möglich.

Von drei verschiedenen Wirtsstämmen, die aufgrund ihres $recA^-$-Phänotyps für die Cosmidklonierung in Frage kommen, wurden in vier unabhängigen Versuchsreihen relative Transfektionseffizienzen ermittelt. Die E. coli Stämme 490A, HB 101 (48) und DH 1 (49) verhielten sich dabei gegenüber einer Phagensuspension mit in vitro verpackter Cosmid-DNA unterschiedlich: E. coli 490A lieferte eine hundertfach bessere Ausbeute an Cosmidklonen als E. coli DH 1 und eine zehnfach bessere Ausbeute als E. coli HB 101. Aufgrund dieser Beobachtung wurde E. coli 490A als Wirtsstamm gewählt.

Für die Induktion von Phagenrezeptoren im Wirtsstamm sind zwei Methoden beschrieben:

1.) Wachstum der E. coli Zellen in Gegenwart von 0,2% Maltose (37)
2.) Aushungern der Zellen in Gegenwart von $MgSO_4$ (50)

Mit der zweiten Methode wurden konstant höhere Ausbeuten an rekombinanten Cosmidklonen erziehlt (Faktor 2); sie erhielt daher den Vorzug vor der Maltoseinduktion.

Eine weitere Erhöhung der Effizienz kann durch die in 2.1.1. angegebenen Fraktionierungsschritte erreicht werden:

1.) Isolierung der Vektoranteile, die die cos-Region enthalten
2.) Größenfraktionierung der phosphatasebehandelten Partialverdaufragmente.

Durch diese beiden Schritte wird die Entstehung von Ligierungsprodukten minimiert, die nicht in vitro verpackt werden können (z.b. rekombinante Konstrukte mit DNA-Insertionen unter 30 kb).

Ein Unterschied der Ligierbarkeit von phosphatasebehandelten Donor-DNA-Fragmenten, im Gegensatz zu nicht dephosphorylierten Fragmenten, konnte nicht beobachtet werden.
Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu größenfraktionierter Donor-DNA hatte einen deutlichen Einfluß auf die Ausbeute an rekombinanten Cosmidklonen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 1 dargestellt.

Molares Verhältnis		Cosmidklone
Vektor-DNA :	Donor-DNA	pro µg Donor-DNA
1	1	$2,5 \times 10^4$
2	1	$5,0 \times 10^4$
4	1	$8,0 \times 10^4$
6	1	$2,0 \times 10^5$
8	1	$2,5 \times 10^5$
10	1	$2,5 \times 10^5$

Tabelle 1 Einfluß des molaren Verhältnisses von Vektor-DNA zu größenfraktionierten Donor-DNA-Fragmenten im Ligierungsansatz

Alle Ligierungen wurden bei einer DNA-Konzentration von 0,4µg/µl durchgeführt. In vitro Verpackung und Transfektion erfolgten in der in 4.2.1.4. und 4.1.2.5. beschriebenen Weise. Die Daten wurden in mehreren unabhängigen Versuchen ermittelt.

2.1.5. Übersicht über die analysierten Cosmidgenbanken

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Genbanken etabliert bzw. untersucht. Dies war zum einen dadurch bedingt, daß alle Genbanken, trotz Konservierung der Cosmidklone auf Glyzerinagar bei -20°C, von begrenzter Lebensdauer waren, zum anderen konnten

die Nitrozellulosemembranen aufgrund ihrer Labilität gegenüber mechanischer Beanspruchung nicht für beliebig viele Hybridisierungsversuche herangezogen werden.

Genbank	Zahl der Cosmidklone	Genom-äquivalente	Vektor	Donor-fragmente	Such-klone
IIIa	$3{,}5 \times 10^5$	4,7	pHC 79	Sau 3A	m1-3
IIIb	$1{,}5 \times 10^6$	20,0	pHC 79/ pJB 8	"	m166-1, m143-1 m167-1 m607V-3 m106-1 mJIuL-16
IIIc	$7{,}0 \times 10^5$	9,4	"	"	m144-2
IVa	$2{,}5 \times 10^5$	3,3	pHC 79	Msp I	m607V-3 m106-1
IVb	$3{,}5 \times 10^5$	4,7	"	Taq I	m607V-3 m106-1

Tabelle 2 Übersicht über die analysierten Cosmidgenbanken

Bei der Berechnung der Genomäquivalente wurde eine mittlere Insertgröße von 40 kb für die rekombinanten Cosmidklone zugrunde gelegt. Die Komplexität des menschlichen Genoms geht mit 3×10^9 bp in die Rechnung ein. Die angegebenen Suchklone sind in den nachfolgenden Kapiteln und in 4.1.2. beschrieben. Die Konstruktion der Genbanken IVa und IVb ist in (51) beschrieben.

Die verwendeten Genbanken werden im folgenden mit den Symbolen IIIa, b, c und IVa, b bezeichnet. Alle Genbanken wurden ausgehend von der Plazenta-DNA desselben menschlichen Individuums (Plazenta St) konstruiert.
Die Genbanken IIIa, b, c wurden nach dem in 2.1.1. beschriebenen Prinzip konstruiert. Für Teile der Genbanken IIIb und IIIc wurde der Cosmidvektor pJB8 verwendet. Genbank IVa, b wurde von B. Straubinger (51) etabliert. Die Partialspaltungsfragmente wurden durch die Nukleasen Msp I bzw. Taq I erzeugt und in die Cla I-Stelle des Cosmidvektors pHC 79 ligiert. Die Verwendung von insgesamt drei verschiedenen Nukleasen (Sau 3A, Taq I und Msp I) für die Partialspaltungen erhöht die statistische Wahrscheinlichkeit, jede beliebige Region in Form rekombinanter Cosmidklone zu isolieren (vgl. auch Kapitel 3.6.).
Eine Übersicht über die untersuchten Genbanken ist in Tabelle 2 dargestellt.

2.2. Isolierung von Cosmidklonen aus Genbanken

2.2.1. Optimierung der Bedingungen für die Koloniefilterhybridisierung

Eine wesentliche Vorraussetzung für die erfolgreiche Isolierung von rekombinanten Cosmidklonen aus Genbanken mit der Methode der Koloniefilterhybridisierung sind deutliche Hybridisierungssignale bei einem niedrigen Hintergrund an unspezifisch gebundener Radioaktivität. In der vorliegenden Arbeit wurde daher besondere Sorgfalt auf die Ausarbeitung von Hybridisierungsbedingungen verwendet, die reproduzierbar gute Ergebnisse liefern.

Alle verwendeten Suchklone für Cosmidisolierungen wurden in Bakteriophage-M13-Vektoren konstruiert. Diese Vektoren enthalten einen Teil der lac-Region von E. coli (52). Die RF-DNA dieser Phagenklone kann daher nicht direkt für Koloniefilterhybridi-

sierungen eingesetzt werden, da sonst eine Hybridisierung des Vektors mit der lac-Region des Wirtsstamms E. coli eintreten würde. Deswegen wurden die in den Suchklonen inserierten Restriktionsfragmente durch präparative Gelelektrophorese (4% Polyacrylamidgele, vgl. 4.2.3.) isoliert.

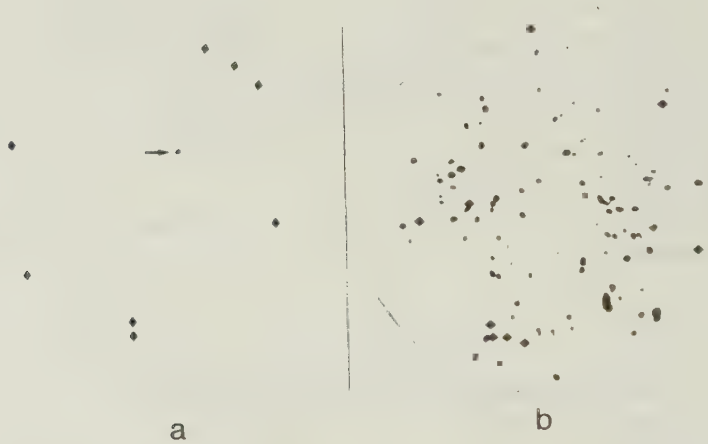


Abb.3 Autoradiogramme von Koloniefilterhybridisierungen

a) Koloniefilterhybridisierung bei hoher Koloniedichte: Die Region der hybridisierenden Kolonie ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. ◆ =Markierungspunkte, die eine Orientierung des Autoradiogramms relativ zur Original-Agarplatte erlauben.
b) Anreicherung des Primärsignals in einer zweiten Hybridisierungsrunde.

Hybridisierungsbedingungen: 4xSSC, 1xDenhardt (68), 1%SDS, 100µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA, 100µg/ml denaturierte E. coli-DNA, 1µg/ml denaturierte M13 mp7 Hae III-Fragmente; 20ng/ml ^{32}P-markierte DNA (spez. Aktivität: $2x10^8$ dpm/µg). Die Hybridisierung erfolgte für 20h bei 68°C. Nach mehreren dekontaminierenden Waschschritten wurden die Filter 12h mit einer Verstärkerfolie (Cawo MRE 600) exponiert.

Da Fragmente unterhalb einer Größe von 1 kb nicht effizient mit der Methode der "Nick-Translation" markiert werden können (53, 54), wurden die isolierten Insert-DNA's mit T4 DNA-Ligase (DNA-Konzentration 200µg/ml) behandelt. Hierbei tritt einen Bildung von Multimeren des Fragments ein (mittlere Größe 25-50 kb). Die Ligierung von Fragmenten mit unterschiedlichen Enden verläuft weniger effizient. Diese Multimere können mit hoher spezifischer Aktivität markiert werden (1-2x10^8 dpm/µg DNA).
Zur Erhöhung des radioaktiven Hintergrunds bei der Koloniefilterhybridisierung tragen minore DNA-Verunreinigungen in der Probenpräparation (M13-DNA, E. coli-DNA) in erheblichem Maße bei. Die Filter wurden daher mit einem großen Überschuß an nichtradioaktiver E. coli-DNA und M13-DNA vorhybridisiert (siehe Bildlegende zu Abbildung 3)
Zur Reduzierung unspezifischer Effekte ist eine SDS-Konzentration von 1% bei der Vorhybridisierung, Hybridisierung und anschließenden Waschschritten von entscheidender Bedeutung. Um scharfe, deutliche Hybridisierungssignale zu erhalten ist es weiterhin wichtig, möglichst kleine Bakterienkolonien zu verwenden (55).

2.2.2. Isolierung von Cosmidklonen mit Subgruppen-spezifischen Suchklonen; erste Charakterisierung der erhaltenen Isolate.

Am Anfang der Arbeit stand ein kloniertes menschliches V_K-Gensegment der Subgruppe I (V_KI) zur Verfügung, welches von H.R. Jaenichen als M13-Subklon aus dem rekombinanten Phagen Chl konstruiert wurde (20). Die Insertion dieses M13-Phagenklons (ml-3) umfasst nahezu die gesamte codierende Region eines V_KI-Keimbahnsegments (Signalpeptid-FR3). Das Ziel war, mit Hilfe dieses Suchklons möglichst alle V_KI-Keimbahngensegmente aus der menschlichen Cosmidgenbank IIIa zu isolieren.

Insgesamt wurden 43 rekombinante Cosmidklone mit ml-3 isoliert. Von diesen Klonen wurde DNA präpariert und mit verschiedenen Restriktionsnukleasen (Bgl II, Bam HI, Pst I, Eco RI) gespalten. Die Spaltprodukte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf

Nitrozellulosefilter transferiert. Ziel dieser Analyse war es, Gruppen überlappender oder eng verwandter Cosmidklone zu definieren. Kriterium hierfür waren: Ähnlichkeiten im Spaltmuster bei den erwähnten Restriktionsspaltungen, Auftreten charakteristischer Fragmentgrößen bei der Hybridisierung mit dem V_KI-Suchklon ml-3 sowie Hybridisierungssignale mit dem Subklon ml6-20, der für die sogenannten L-Sequenzen spezifisch ist (56). L-Sequenzen kommen im 3'-Flankenbereich bestimmter V_KI-Gensegmente vor, erkennen aber auch andere genomische Regionen, die keine V_K-Gene enthalten.
Die Hybridisierung mit der L-Sequenzprobe ml6-20 erwies sich als nützlich: Von den 43 isolierten Cosmidklonen gaben 10 Klone ein positives Hybridisierungssignal (vgl. Tabelle 3). Nach genauerer Analyse (44, 57) konnte gezeigt werden, daß die Restriktionskarten dieser Klone eine Region des menschlichen V_K-Locus definieren (L-Region), die etwa 100 kb umfasst.
Ein weiteres diagnostisches Gruppenmerkmal ergab sich nach der Spaltung aller Klone mit der Restriktionsnuklease Pst I und Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Fragmente mit dem V_KI-Suchklon ml-3: Der größte Teil der untersuchten Cosmidklone zeigte hierbei hybridisierende Pst I-Fragmente der Größe 0,56 kb bzw. 0,68 kb. Eine Gruppe von 7 Cosmidklonen fiel bei diesem Versuch durch das Auftreten eines hybridisierenden Pst I-Fragments der Größe 1,0 kb auf. 6 Cosmide aus dieser Gruppe zeigten überdies deutliche Spaltmusterhomologien nach elektrophoretischer Auftrennung der Bgl II-, Bam HI- und Eco RI-Fragmente (vgl. Tabelle 3). Diese 6 Cosmidklone wurden mit Restriktionsnukleasen kartiert (vgl. 2.3.1.). Die hierdurch definierte Region wurde als W-Region bezeichnet.
Weitere überlappende Cosmidklone konnten aufgrund von Spaltmusterähnlichkeiten oder dem Auftreten von gleichen Bgl II- bzw. Bam HI-Fragmentgrößen bei der Hybridisierung mit dem V_KI-Suchklon (ml-3) erkannt werden (Region O, A, Chr. 1; siehe Tabelle 3).
8 Cosmidklone erwiesen sich als paarweise identisch. Das Ergebnis der Voranalyse ist in Tabelle 3 zusammengefasst.
15 Cosmidklone konnten bei dieser ersten Charakterisierung nicht sinnvoll gruppiert werden. Aufschluß über ihre Struktur und besonderen Merkmale konnten erst nach einer genaueren Analyse durch

andere Mitglieder der Arbeitsgruppe erhalten werden (cos 118-120, Zitat (58); cos 155-162 und cos 210, Zitat (51); cos 108-110, Zitat (64)). Als bemerkenswertes Ergebnis dieser Untersuchungen sollte erwähnt werden, daß einige der isolierten V_KI-Gene auf anderen Chromosomen als Chromosom 2 lokalisiert werden konnten (59). Das bedeutet, daß Transpositionsereignisse während der Evolution stattgefunden haben müssen, bei denen einzelne V_K-Gensegmente aus dem Verband der Multigenfamilie auf Chromosom 2 auf andere Chromosomen gelangt sind.

Cosmid		Gruppenmerkmale	Bezeichnung der Region
1.)	cos 100	Hybridisierungssignale mit	L-Region
2./	cos 100	der L-Sequenz Probe m16-20;	(44, 57, 63)
3.)		Homologien im Spaltmuster	
4.)	cos 102		
5.)	cos 100		
6./	cos 104		
7.)			
8.)	cos 105		
9.)	cos 106		
10.)	cos 107		
11.)	cos 165	V_KI-Gensegmente auf 1 kb	W-Region
12.)	cos 166	Pst I-Fragment (Probe m1-3);	
13.)	cos 167	Homologien im Spaltmuster	
14.)	cos 168		
15.)	cos 169		
16.)	cos 170		

(Fortsetzung umseitig)

17.)	cos 164	V_KI-Gensegment auf 1 kb PstI-Fragment (Probe m1-3)	E-Region (51)
18.)	cos 143	Homologien im Spaltmuster	O-Region
19.)	cos 144,		
20.)	cos 163	Homologien im Spaltmuster	A-Region (51)
21.)	cos 142		
22./	cos 117	Homologien im Spaltmuster	Chr.1
23.)			
24.)	cos 115		
25.)	cos 114		
26.)	cos 113		
27./	cos 116		
28.)			

Tabelle 3 Gruppeneinteilung der Cosmide, die mit der V_KI-spepezifischen Probe m1-3 isoliert wurden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit standen Proben für die anderen V_K-Subgruppen zur Verfügung. Um zu überprüfen, ob innerhalb des untersuchten Locus Regionen existieren, die nicht von dem V_KI-Suchklon erkannt worden waren, wurden die Cosmidgenbanken IIIb, IVa und IVb mit zwei V_KII-spezifischen Suchklonen analysiert. Eine der verwendeten Proben (m607V-3) wurde von H.G.Klobeck (60) konstruiert. Dieser Klon enthält ein Bam HI/Sph I-Fragment von 290 bp, welches die Regionen L', FRI, CDRI, FRII, CDRII und FRIII des, in der lymphoblastoiden Zellinie GM 607 produktiv umgelagerten V_KII-Gensegments umfasst. Als zweiter Suchklon wurde ein von M.Pech (57) subkloniertes V_KII-Pseudogensegment aus der L-Region (V_c'') verwendet. Der durch diesen Klon (m106-1, PstI-Fragment, 448 bp) abgedeckte Bereich umfasst

die Regionen von CDRI bis 50 bp der 3'-Flanke des Gensegments. Beide Proben sind zu 75% homolog (Nukleotidsequenzvergleich: E.Huber (61)).

Insgesamt wurden mit diesen V_KII-Proben 31 rekombinante Cosmidklone isoliert (vgl. Tabelle 4). Von den Cosmidklonen wurde DNA präpariert und durch vergleichende Restriktionsspaltungen (Enzyme: Bam HI, Bgl II, SmaI, PstI) analysiert. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit standen bereits mehrere Suchklone zur Verfügung, die eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Isolate zu einzelnen definierten Regionen (A,B,E,L,O,W,) zuließen. Die elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente wurden mit diesen regionspezifischen Suchklonen hybridisiert. In den meisten Fällen konnte eine eindeutige Zuordnung zu den bereits definierten Regionen erfolgen. Darüber hinaus wurden Hybridisierungen mit Subgruppen-spezifischen Suchklonen durchgeführt (vgl. Tabelle 4), die Aufschluß darüber geben sollten, ob über die bereits bekannten Gene hinaus weitere Mitglieder der V_K-Multigenfamilie isoliert wurden. Dazu wurden Spaltungen einiger mit ml-3 isolierter Cosmide auf den Gelen mitelektrophoretisiert.
In Tabelle 4 ist das Ergebnis dieser ersten Charakterisierung dargestellt. Einige Cosmidklone konnten erst nach eingehender Analyse durch verschiedene Mitglieder der Arbeitsgruppe bestimmten Regionen zugeordnet werden (siehe Zitate in Tabelle 4). Von den isolierten Klonen ließen sich zwei überlappende Cosmide nicht einer der bereits definierten Regionen zuordnen. Der durch diese beiden Klone abgedeckte Bereich wurde als T-Region bezeichnet. Die Kartierung der T-Region ist in 2.3.5. beschrieben.
In einem fortgeschritteneren Stadium der Arbeit stand ein spezifischer Suchklon für die V_K-Subgruppe IV zur Verfügung (mJIuL-16;(62)). Die Subgruppe IV ist innerhalb der V_K-Multigenfamilie durch ein einziges Gensegment (haploides Genom) vertreten. Dies geht aus Untersuchungen von Klobeck et al. (62) hervor. Mit Hilfe der Probe mJIuL-16 konnte ein rekombinanter Cosmidklon (cos 111) aus der Genbank IIIb isoliert werden, welcher das V_KIV-Keimbahngensegment sowie flankierende Regionen enthält. Die Charakterisierung dieses Cosmidklons (B-Region) ist in Kapitel 2.3.4. beschrieben.

	BglII-Spaltg. m607V-3 (V_KII)	PstI-Spaltg. m1-3 (V_KI)	m21-4 V_KIII	m21-1 L-Reg.	m166-7 W-Reg.	m166-4 W-Reg.	m142-1 A-Reg.	Zuordnung **Region**
1.cos660	+	550/680bp	+	+	-	-	-	L
2.cos659	0	1kb	+	-	(+)	+	-	A
3. "								
4.cos654	+	550bp	+	-	(+)	+	-	W
5.cos658	+	550/680bp	+	+	-	-	-	L
6.cos661	+	1kb	-	(+)	+	-	(+)	W
7.cos507	+	550bp	+	+	-	-	-	L
8. "								
9.cos506	+	550bp	+	+	-	-	-	L
10. "								
11.cos509	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	L
12.cos202	+	1kb	-	-	+	-	(+)	W
13. "								
14.cos203	0	-	-	-	(+)	-	(+)	E
15.cos127	+	-	0	+	-	-	-	L
16. "								
17.cos204	+	550/680bp	-	+	-	-	(+)	L
18.cos205	+	1kb	+	+	-	-	(+)	L

19.cos128	+	550bp	+	+	-	-	-	L
20. "								
21. "								
22.cos206	0	500bp	0	-	(+)	-	(+)	T
23.cos207	0	-	-	-	-	-	(+)	E
24.cos208	0	550/800bp	+	+	-	-	-	L
25. "								
26.cos209	0	-	0	-	(+)	-	-	T
27.cos655	+	550bp	+	+	-	-	-	L
28.cos657	+	550bp/1kb	+	-	+	+	-	W
29.cos656	+	-	+	-	(+)	-	(+)	A
30.cos502	+	550bp	+	+	-	-	(+)	L
31.cos503	+	-	+	+	-	-	-	L

Tabelle 4 Erste Charakterisierung von Cosmidklonen, die mit V_KII-spezifischen Proben isoliert wurden.

Beschreibung der verwendeten Suchklone: m607V-3, Zitat (60); m1-3, Zitat (20); m21-4, Zitat (63); m21-1, Zitat (57), m142-1, Zitat (51); m166-7 und m166-4 siehe Kapitel 2.4.1. .

Symbole: + = Hybridisierungssignal; (+) = Hybridisierungssignal, Fragment besitzt nicht die, für die betreffende Region charakteristische Größe; 0 = Fragmentgröße bei V_K-Hybridisierungen, die in den Vergleichscosmiden nicht auftaucht; n.d. = nicht durchgeführt. Doppelisolate sind in der Tabelle durch zwei laufende Nummern gekennzeichnet

Die Genbanken III und IV wurden von H.G.Bauer mit V_KIII-spezifischen Suchklonen analysiert (58). Wegen der Sequenzheterogenität der V_KIII-Gensegmente (65) wurden hierfür verschiedene Proben eingesetzt. Die isolierten Cosmide waren zu einem erheblichen Anteil mit den in Tabelle 4 beschriebenen Cosmiden identisch. Insgesamt konnten bei diesen Versuchen über die hier vorgestellten Regionen hinaus keine neuen Bereiche des V_K-Locus definiert werden (58).

2.2.3. Qualität der Cosmidgenbanken und der Cosmidisolierungen.

Die Anzahl der zu analysierenden Klone bei Koloniefilterhybridisierungen hängt ab von

a) der Genomgröße des untersuchten Organismus (Mensch: $3x10^9$ bp/haploides Genom)
b) der Aufnahmekapazität des verwendeten Vektorsystems (Cosmide: durchschnittliche Insertgröße 40 kb)
und
c) der gewünschten Auffindungswahrscheinlichkeit P.

Eine Gleichung von Clarke und Carbon (66) liefert den mathematischen Zusammenhang zwischen diesen Größen:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

wobei: N - Zahl der zu untersuchenden Klone
P - gewünschte Auffindungswahrscheinlichkeit
f - Größenverhältnis: $\frac{\text{mittlere zu erwartende Insertgröße}}{\text{Größe des Gesamtgenoms}}$

Bei einer Auffindungswahrscheinlichkeit von 99% (P=0.99) ergeben sich für eine menschliche Cosmidgenbank 350 000 zu untersuchende Klone (Zahl der untersuchten Klone in Cosmidgenbank IIIa, siehe Tabelle 2). Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Überlegungen ist eine völlig statistische Fragmentierung der genomischen DNA vor dem Einbau der erzeugten Fragmente in das gewählte Vektorsystem.
Für eine durch partielle Restriktionsspaltung erzeugte Fragmentpopulation wäre dies dann gegeben, wenn das Maximum der erzeugten Fragmentlängen der mittleren Insertlänge des verwendeten Vektorsystems (Cosmide: 40 kb) entspricht. Diese Überlegung trifft jedoch nur unter der Voraussetzung völliger kinetischer Äquivalenz der Restriktionsspaltstellen in genomischer DNA zu (67). Dies ist jedoch nicht gegeben (vgl. 2.1.2.). Hieraus ergibt sich die Forderung nach Anwendung einer möglichst großen Variationsbreite bei den für die Fragmenterzeugung angewandten Partialspaltungsbedingungen. Bei ausreichender Berücksichtigung dieser Forderung erhofft man sich eine hinreichende Annäherung an eine statistische Fragmentverteilung (67).
Bei den Genbanken IIIb und IIIc wurde eine wesentlich höhere Anzahl an Kolonien untersucht (siehe Tabelle 2). Diese Genbanken wurden vor allem mit Suchklonen analysiert, welche extendierende Cosmidklone für die in 2.2.2. beschriebenen Regionen erkennen sollten ("chromosomal walking"). Bei dieser Technik kommt es im besonderen Maße darauf an, die genomische Region von Interesse in möglichst vielen unterschiedlichen Fragmentrastern zu isolieren. In Tabelle 5 wird eine quantitative Übersicht über Cosmidisolierungen mit Suchklonen gegeben, die nur eine sehr kleine Anzahl unterschiedlicher genomischer Regionen erkennen. Für eine Abschätzung der Effizienz dieser Versuche wird ein Auffindungsquotient Q definiert, der die Zahl der isolierten Cosmide in Relation zur Zahl der untersuchten Cosmidklone (Zahl der "Genomäquivalente") und der empirisch ermittelten Kopienzahl der Sequenzfamilie in genomischer DNA setzt (vgl. Tabelle 5). Bei 3 von 5 Suchklonen verliefen die Cosmidisolierungen mit ähnlicher Effizienz. Eine schlechtere Ausbeute an rekombinanten Cosmidklonen lieferten die Proben ml66-1 (Faktor: 3-5) sowie mJIuL-16 (Faktor:

6-10). Dies kann an der unterschiedlichen Repräsentanz der untersuchten Regionen liegen, aber auch an technischen Faktoren (Qualität der Koloniefilterhybridisierung).

Suchklon	Kopienzahl	Genbank	Genomäquivalente	Zahl der isolierten Cosmide	Quotient Q
m167-1	2	IIIb	20	22	0,5
m166-1	4	IIIb	20	8	0,1
m143-1	1	IIIb	20	6	0,3
m144-2	1	IIIc	9,4	4	0,44
mJIuL-16	1	IIIb	20	1	0,05

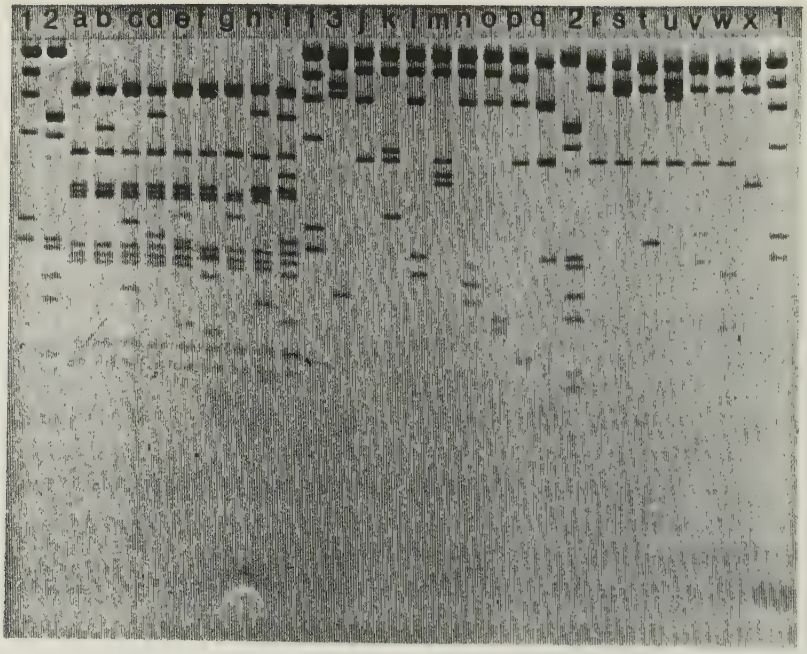
Tabelle 5 Effizienz der Cosmidisolierungen mit Suchklonen, die eine kleine Anzahl unterschiedlicher genomischer Regionen erkennen

Kopienzahl: Genomische DNA wurde mit Restriktionsnukleasen (hexamere Erkennungssequenz) gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer der Fragmente auf Nitrozellulose mit dem Suchklon hybridisiert. Als Kopienzahl wird die Anzahl der unter stringenten Hybridisierungsbedingungen nachgewiesenen Banden verschiedener Größe bezeichnet.

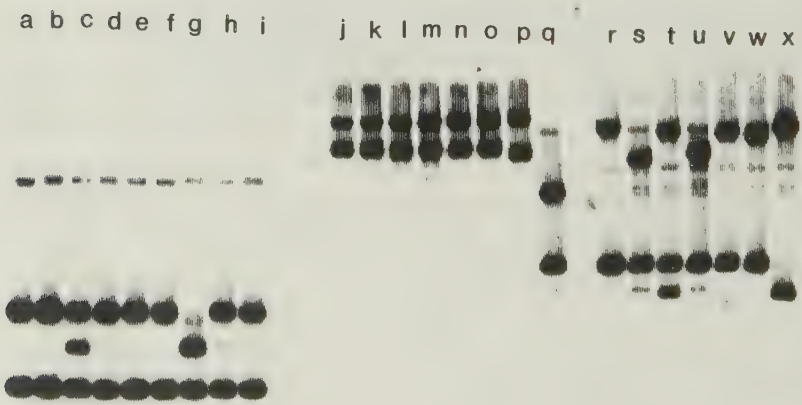
Quotient Q: Zahl der isolierten Cosmide/GenomäquivalentxKopienzahl.

2.3. Kartierung ausgewählter Cosmidklone mit Restriktionsnukleasen

In Kapitel 2.2.2. sind Versuche zur ersten Charakterisierung von Cosmidklonen beschrieben, die mit klonierten V_K-Gensegmenten der Subgruppen I, II und IV aus Cosmidgenbanken isoliert wurden. Durch die beschriebene Analyse konnten Gruppen verwandter, oder überlappender Cosmidklone definiert werden.
Einige der durch diese Cosmidklone repräsentierten Regionen des menschlichen V_K-Locus wurden im weiteren Verlauf der Arbeit einer genaueren Analyse unterzogen. Zunächst wurden Restriktionskarten der Cosmidklone erstellt. Die V_K-Gensegmente auf den kartierten Bereichen wurden durch Hybridisierung mit spezifischen Suchklonen für verschiedene Subgruppen lokalisiert.
Um interpretierbare Fragmentierungsmuster bei der Restriktionsanalyse zu erhalten, wurden neben den Nukleasen Bgl II, Bam HI, Kpn I, vor allem Restriktionsenzyme verwendet, deren Erkennungssequenz das Dinukleotid CpG beinhaltet (Sma I, Xho I, Cla I, Nru I, Sal I und Pvu I). Die Frequenz des Dinukleotids CpG ist in eukaryontischer DNA deutlich erniedrigt (46).
Zur Ermittlung der Reihenfolge der Restriktionsspaltstellen wurde die DNA des jeweils untersuchten rekombinanten Cosmids mit allen genannten Enzymen einzeln, sowie mit Zweierkombinationen der Enzyme verdaut. Die Spaltprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter übertragen (vgl. 4.2.3. und 4.2.5.). Diese Filter wurden dann mit den zur Verfügung stehenden V_K-Proben hybridisiert. Abbildung 4 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer derartigen Analyse.


1 2 a b c d e f g h i 1 3 j k l m n o p q 2 r s t u v w x 1

A


a b c d e f g h i
j k l m n o p q
r s t u v w x

B

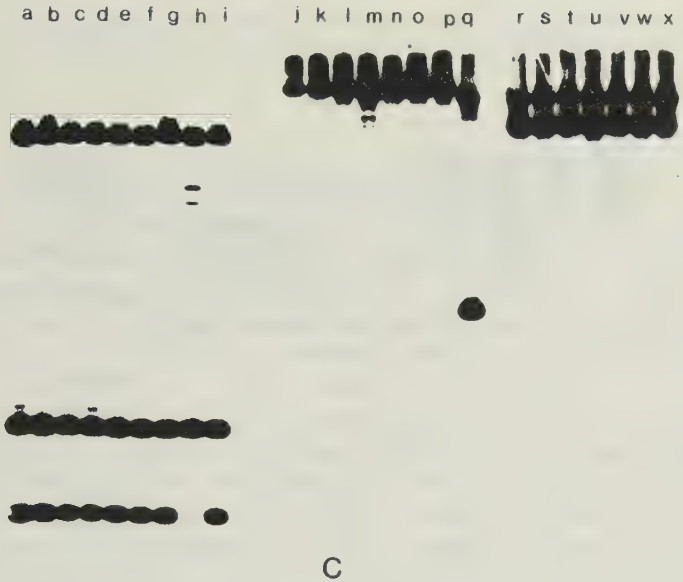


Abb.4 Hybridisierung verschiedener Restriktionsspaltungen des Cosmidklons cos 206 mit subgruppenspezifischen V_K-Suchklonen

A.) Analyse der Restriktionsspaltungen auf einem 0,8%-Agarosegel
Die Bahnen a-x enthalten Restriktionsspaltungen des Cosmidklons cos 206 (a=BglII, b=BglII+ClaI, c=BglII+SalI, d=BglII+PvuI, e=BglII+NaeI, f=BglII+NruI, g=BglII+XhoI, h=BglII+BamHI i=BglII+HpaI, j=HpaI, k=HpaI+ClaI, l=HpaI+SalI, m=HpaI+PvuI, n=HpaI+NaeI, o=HpaI+NruI, p=HpaI+XhoI, q=HpaI+BamHI, r=BamHI, s=BamHI+ClaI, t=BamHI+SalI, u=BamHI+PvuI, v=BamHI+NaeI, w=BamHI+NruI, x=BamHI+XhoI).
Die Größenbestimmung der Fragmente erfolgte durch folgende Molekulargewichtsreferenzen: 1=λ-Wiltyp-DNA gespalten mit HindIII, 2=λ-Wildtyp-DNA gespalten mit HindIII+EcoRI, 3=λ-Wildtyp-DNA gespalten mit StuI.

B.) Autoradiogramm der Hybridisierung elektrophoretisch aufgetrennter Restriktionsfragmente von cos 206 mit der SubgruppeI-spezifischen Probe m1-3.
Die Fragmente des in Abb.4 gezeigten Elektropherogramms wurden auf Membranfilter transferiert (4.2.5.) und mit radioaktiv markierter DNA des Klons m1-3 hybridisiert (4.2.5.).
Die Hybridisierungsbedingungen waren:
300mM NaCl; 30mM Natriumcitrat; 1% SDS; 100µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA; 0,66% Ficoll; 0,66% Polyvinylpyrrolidon 0,66% Rinderserumalbumin; 12h bei 68°C. Die Konzentration der markierten DNA betrug 10ng/ml.

C.) Autoradiogramm der Hybridisierung elektrophoretisch aufgetrennter Restriktionsfragmente von cos206 mit der Subgruppe II-spezifischen Probe m607V-3 **(Abb. 4C; Seite 31).**

In einigen Fällen reichten die Informationen aus Einzel- und Doppelspaltungen sowie Hybridisierungen nicht aus, um die Anordnung der Restriktionsspaltstellen in eindeutiger Weise festzulegen. Bei Cosmiden, die ein sehr komplexes Spaltmuster für einige der genannnten Restriktionsnukleasen aufwiesen, wurden daher weitere Kartierungsmethoden angewandt.

Nach der Methode von Smith und Birnstiel (69) werden lineare DNA-Fragmente an einem Ende markiert und anschließend partiell mit Restriktionsnukleasen verdaut. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte und Autoradiographie erscheint eine Leiter markierter DNA-Fragmente. Die Größe jedes dieser Fragmente gibt den Abstand des markierten Endes zu einer gegebenen Restriktionsspaltstelle an. Der Größenunterschied zwischen zwei aufeinanderfolgenden markierten Fragmenten definiert den Abstand zwischen zwei benachbarten Restriktionsspaltstellen.
Für die Kartierung von Cosmidklonen wurde diese Methode modifiziert: Die Cosmide wurden zunächst mit einer Restriktionsnuklease aus dem Vektoranteil linearisiert (z.B. Pvu I, Sal I oder Cla I) und anschließend partiell mit Restriktionsnukleasen gespalten. Die Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter transferiert. Die Markierung der Fragmente an einem Ende erfolgte indirekt durch Hybridisierung mit DNA-Proben, die eine unmittelbar an die Linearisierungsstelle angrenzende Region erkennen. Als Probe hierfür wurde die RF-DNA des Vektors M13 mp9 verwendet, die ein Hae III-Fragment des Plasmids pBR 322 enthält (J. Messing, persönliche Mitteilung). Die ensprechende Region im Cosmidvektor pHC 79 liegt zwischen der Pvu I-Spaltstelle (Position 3738) und dem Replikationsursprung (Position ca. 2500). Mit Sal I linearisierte Cosmidklone wurden mit λ-Phagen-DNA indirekt endmarkiert.

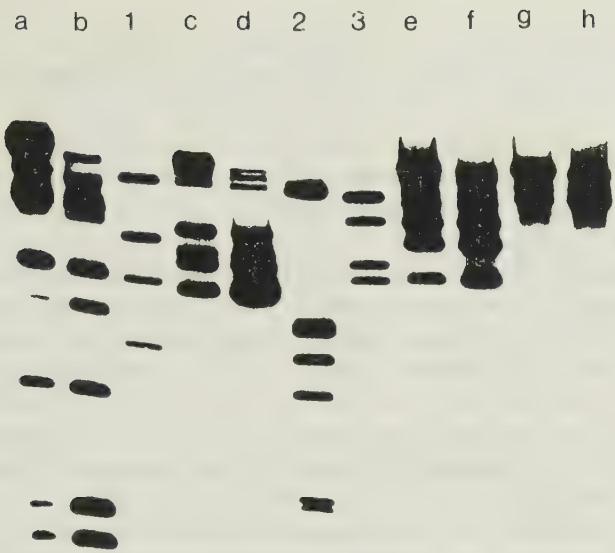


Abb.5 Restriktionskartierung von Cosmidklonen durch Partialverdau und indirekte Endmarkierung

Die Abbildung zeigt exemplarisch ein Autoradiogramm, welches nach partieller Spaltung des mit SalI linearisierten Cosmids cos 171 und Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Partialverdaufragmente mit radioaktiv markierter DNA des Phagen λ erhalten wurde.
Für die einzelnen Restriktionsnukleasen wurden jeweils verschieden weit abgebaute Produkte in zwei aufeinanderfolgenden Bahnen aufgetrennt (a,b=BglII; c,d=BamHI; e,f=SmaI; g,h=KpnI).
Als Molekulargewichtsreferenzen wurden verschiedene Spaltungen von Bakteriophagen-λ-DNA verwendet (1= λ/HindIII, 2= λ/HindIII+ EcoRI, 3= λ/StuI).
Die elektrophoretisch aufgetrennten Reaktionsprodukte wurden auf Membranfilter transferiert (4.2.5.) und mit radioaktiv markierter λ-DNA hybridisiert.

Mit dieser Methode war es bei einigen Cosmiden möglich, die Spaltstellenabfolge ausgehend von beiden Enden des linearisierten Moleküls zu ermitteln. In Abbildung 5 ist beispielhaft ein Autoradiogramm von elektrophoretisch aufgetrennten, indirekt endmarkierten Restriktionsfragmenten gezeigt.
In Einzelfällen wurden größere Restriktionsfragmente präparativ aus Agarosegelen isoliert, um interne Spaltstellen durch Nachspaltung mit verschiedenen Restriktionsnukleasen zu ermitteln.

2.3.1. Charakterisierung von Cosmidklonen der W-Region

Mit dem V_K-I spezifischen Suchklon m1-3 wurde eine Gruppe von 6 eng verwandten Cosmidklonen isoliert (siehe 2.2.2.), die die Region W definieren.
Von diesen Cosmidklonen wurden Restriktionskarten erstellt. Die Lage der V_K-Gensegmente wurde durch Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente mit subgruppenspezifischen Suchklonen ermittelt. Die Restriktionskarten der Cosmidklone cos 165, cos 169 und cos 167 erwiesen sich in den jeweils überlappenden Bereichen als identisch. Der durch diese Cosmidklone abgedeckte Bereich (70 kb) erhielt die Bezeichnung Wa-Region. Bei der Erstellung der Restriktionskarte des Cosmidklons cos 168 waren Hybridisierungsversuche von F.J. Zimmer mit einem klonierten Restriktionsfragment aus der Wa-Region hilfreich (70).

Die Restriktionskarten der Klone cos 166 und cos 170 zeigen im überlappenden Bereich (38 kb) eine perfekte Übereinstimmung. Der durch diese Cosmidklone abgedeckte Bereich erhielt die Bezeichnung Wb-Region.
Die Regionen Wa und Wb weisen ein hohes Maß an struktureller Homologie bezüglich der Abfolge der Restriktionsfragmente, sowie bezüglich des Abstandes und der Art der Subgruppe der einzelnen V-Gensegmente auf. In Kapitel 2.5.2. wird gezeigt, daß die strukturellen Homologien der Subregionen Wa und Wb auf ein Duplikationsereignis zurückgeführt werden können.
In Kapitel 2.2.2. ist die Isolierung von Cosmidklonen mit spezifischen Proben für die Subgruppe II der V_K-Gensegmente beschrieben, sowie die erste Charakterisierung der erhaltenen Isolate. Von den erhaltenen rekombinanten Cosmidklonen konnten folgende Klone der W-Region zugeordnet werden: cos 654, cos 661, cos202 und cos 657. Für diese Zuordnung wurden spezifische M13-Subklone aus der W-Region konstruiert: Der Phagenklon m166-3 erkennt einen Abschnitt (Bgl II-Fragment; 0,9 kb) zwischen den

Genen W6 und W7 (siehe Abbildung 6). Der Klon m166-4 erkennt die 5'-Flankenregion der V_K-Gensegmente W1 und W7. Der Subklon m166-7 erkennt die 5'-Flanke der V_KI-Gensegmente W3 und W9.
Mit Hilfe dieser Klone war es möglich, die ungefähre Lage der neu isolierten Cosmidklone innerhalb der erstellten Restriktionskarte zu ermitteln. Die Zuordnung zu den Regionen Wa oder Wb war aufgrund der Existenz diagnostischer Restriktionsfragmente möglich: Ein Xho I-Fragment der Größe 2 kb auf der 3'-Seite des Gensegments W9 ist charakteristisch für die Wb-Region. Ein Xho I-/ Nru I-Fragment von 1,3 kb auf der 3'-Seite des Gensegments W1 wurde als typisches Merkmal der Wa-Region für derartige Analysen herangezogen.
Von anderen Mitgliedern der Arbeitgruppe wurden ebenfalls Cosmidklone isoliert die Teile der W-Region enthalten: Von B. Straubinger (51) wurde mit dem Suchklon m142-1 ein Cosmidklon isoliert, der Teile der Wa-Region enthält. Der M13-Phagenklon m142-1 enthält ein Restriktionsfragment aus der 3'-Flanke eines V_KII-Gensegments der A-Region und erkennt eine homologe Stelle in Wa und Wb (siehe Abbildung 6). Zwei weitere Cosmidklone der W-Region wurden von B. Straubinger mit der V_KII Probe m607-V3 aus der Cosmidgenbank IIIc isoliert.
Von den bisher aufgeführten Cosmidklonen extendiert nur ein rekombinantes Cosmid die in Abbildung 6 dargestellte Struktur: Der Klon cos 654, welcher mit den V_KII-Proben m607-V3 und m106-1 aus der Genbank IVa isoliert wurde (siehe Kapitel 2.2.2.), erweitert die Wb-Region in 5'-Richtung (70). Gleiches gilt für das Cosmid cos 140, welches von H.G. Bauer mit einer V_KIII-spezifischen Probe isoliert wurde (58). Alle anderen Cosmidklone liegen innerhalb der, durch die mit m1-3 isolierten Cosmidklone definierten Grenzen.
In Tabelle 6 ist die Lage der Cosmidklone, die nicht in Abbildung 6 eingezeichnet sind zusammenfassend dargestellt. Die Analyse der extendierenden Cosmidklone ist in Kapitel 2.4.3. beschrieben.

Cosmid	Isoliert mit Suchklon	Subregion	Lage (Kartenposition)	Bemerkung
cos 654	m607V-3 m106-1	Wb	vgl.2.4.3.	exten- dierend
cos 661	m607V-3 m106-1	Wa	18-60 kb	
cos 202	m607V-3 m106-1	Wa	10-60 kb	
cos 657	m607V-3 m106-1	Wb	0-40 kb	
cos 220	m607V-3	Wa	0-30 kb	
cos 221	m607V-3	Wa	0-30 kb	
cos 225	m142-1	Wa	30-75 kb	
cos 140	m21-4	Wb	vgl.2.4.3.	exten- dierend

Tabelle 6 Lage weiterer Cosmidklone innerhalb der Regionen Wa und Wb

Abb.6 (Bildlegende umseitig)

Abb.6 Restriktionskarten der Regionen Wa und Wb. Die eingezeichneten Cosmidklone wurden mit der V_KI-spezifischen Probe ml-3 isoliert

Die Restriktionskarten der aufgeführten Cosmidklone sind für beide Teilregionen (Wa und Wb) zusammenfassend dargestellt. Die Lage weiterer Cosmidklone, die mit anderen Suchklonen isoliert wurden, ist in Tabelle 6 beschrieben.
Spaltstellenpositionen, die für beide Regionen identisch sind und Positionen in nur einmal vorhandenen Regionen, werden durch senkrechte Striche wiedergegeben. Spaltstellen, die nur in einer von beiden Regionen vorhanden sind werden durch spitze Dreiecke gekennzeichnet.
Als weitere Symbole werden verwendet:
———=subklonierte Bereiche
·—·—·=Homologieregion; Bereich der mit dem Subklon ml42-1 (A-Region) hybridisiert.
Geschlossene Balken symbolisieren die V-Gensegmente. Die einzelnen Gene gehören folgenden Subgruppen an: 1-Subgr.II, 2-Subgr.II, 3-Subgr.I (Pseudogen, Sequenzanalyse R. Thiebe), 4-Subgr.II, 5-Subgr.III, 6-Subgr.I, 7-Subgr.II, 8-Subgr.II, 9-Subgr.I.
Die Karten sind so angeordnet, daß homologe Bereiche genau übereinander liegen. Dadurch wird der Vergleich beider Regionen erleichtert. Wegen der Homologiemaximierung ist ein in der Region Wa zusätzlich enthaltenes DNA-Segment (70) (Länge ca. 3 kb; Kartenposition 42 kb) gesondert herausgezeichnet. Der Maßstab bezieht sich auf Cosmidlängen, unabhängig von dem herausgezeichneten Abschnitt.

2.3.2. Charakterisierung von Cosmidklonen der O-Region

Eine weitere Region des menschlichen V_K-Locus wurde in Form zweier rekombinanter Cosmidklone (cos 143 und cos 144) mit dem SubgruppeI-spezifischen Suchklon ml-3 isoliert. Sie erhielt die Bezeichnung O-Region (siehe Kapitel 2.2.2.).
In Abbildung 7 ist die Restriktionskarte der O-Region dargestellt.

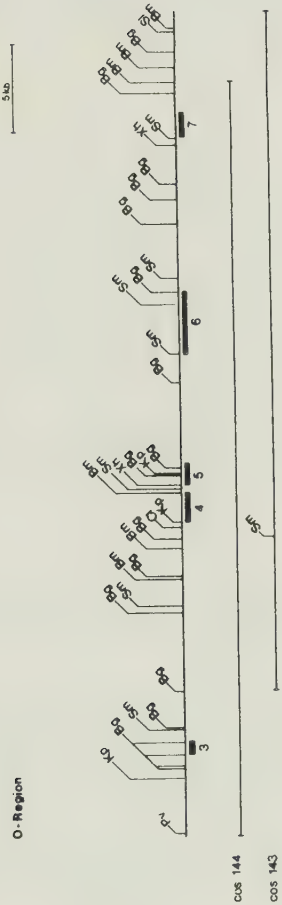


Abb. 7 (Bildlegende umseitig)

Abb.7 Restriktionskarte der Cosmidklone cos 143 und cos 144 (O-Region)

Beide Cosmidklone wurden mit der SubgruppeI-spezifischen Probe ml-3 isoliert. Die für die Restriktionsnukleasen verwendeten Symbole sind am Ende der Arbeit (7. Abkürzungen und Erläuterungen) erklärt.

Die Lage der V-Gensegmente innerhalb der O-Region wurde durch Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente mit verschiedenen V_K-Proben ermittelt. Beide Cosmidklone sind bezüglich der Abfolge der kartierten Restriktionsspaltstellen im überlappenden Bereich (36 kb), mit Ausnahme einer Sma I-Stelle in der 5'-Flanke des V_KI-Gens 04, identisch. Die mögliche Bedeutung dieses Strukturunterschieds wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.
Die Identifizierung des V_KII-Gensegments 03 war durch Hybridisierungsversuche von A. Meindl (77) möglich.

2.3.3. Charakterisierung von Cosmidklonen der Region Chr.1

Bei der ersten Charakterisierung der Cosmidisolate, die mit ml-3 aus der Genbank IIIa erhalten wurden, konnte eine Gruppe von 7 Klonen identifiziert werden, die ein hohes Maß an Homologie bei vergleichenden Restriktionsspaltungen aufwiesen (siehe Kapitel 2.2.2.).
Die Restriktionskarten dieser Klone sind in Abbildung 8 dargestellt.

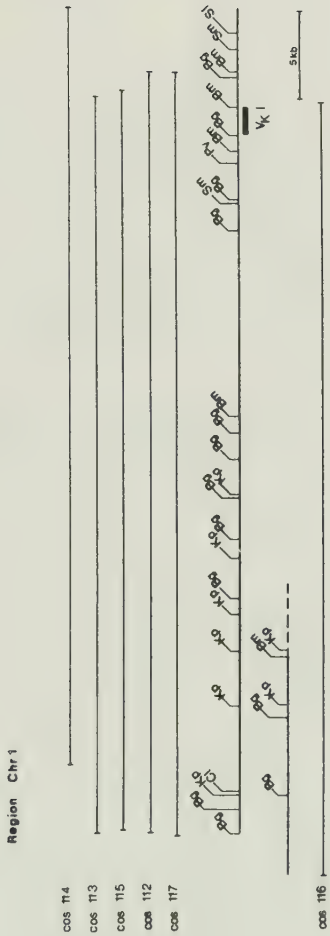


Abb.8 (Bildlegende umseitig)

Abb.8 Restriktionskarte der Region Chr.1

Die dargestellten Cosmidklone wurden mit der Subgruppe1-spezifischen Probe m1-3 isoliert. Die für die Restriktionsnukleasen verwendeten Symbole sind am Ende der Arbeit (7. Abkürzungen und Erläuterungen) erklärt.

Alle Klone überlappen in einem sehr engen Raster. Bei 5 Klonen konnte eine perfekte Übereinstimmung der Restriktionskarten in den überlappenden Bereichen festgestellt werden. Eine abweichende Struktur zeigt der Cosmidklon cos 116, der in Form zweier unabhängiger Isolate gewonnen wurde (vgl. 2.2.2., Tabelle 3). Die festgestellten Spaltstellenunterschiede (vgl. Abbildung 8) beschränken sich auf den 5'-terminalen Bereich der Restriktionskarte. Die mögliche Signifikanz dieses Strukturunterschieds wird in Kapitel 3.2. diskutiert.
Zur Erstellung der Restriktionskarte wurden neben den üblichen analytischen Spaltungen einzelne Restriktionsfragmente präparativ isoliert, um die Lage interner Spaltstellen durch Nachspaltung mit anderen Nukleasen zu ermitteln. Dies war aufgrund der monotonen Abfolge von Kpn I- und Bgl II-Spaltstellen im mittleren Bereich der Region erforderlich.
Ein auffälliges Merkmal der in Abbildung 8 dargestellten Region ist das Fehlen von V_K-Gensegmenten über einen Bereich von 35 kb in 5'-Richtung des einzigen V-Gensegments, welches in dem Gesamtbereich 50 kb lokalisiert werden konnte. Von E. Lötscher wurden mit Hilfe des Extensionssuchklons m115-1 Cosmide isoliert, die die in Abbildung 8 dargestellte Struktur um weitere 30 kb erweitern (71). Auch bei den extendierenden Cosmidklonen konnten keine weiteren V-Gensegmente nachgewiesen werden (59).
Der Subklon m1-3 wurde von E. Lötscher zur Analyse der DNA's verschiedener Mensch-Nager-Zellhybridlinien verwendet. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die in Abbildung 8 dargestellte Region auf dem menschlichen Chromosom 1 liegt (59). Für diese Struktur wurde daher die Bezeichnung Chr1 eingeführt.

2.3.4. Charakterisierung eines Cosmidklons, der ein V_K-Gensegment der SubgruppeIV enthält (B-Region)

In Kapitel 2.2.2. ist die Isolierung eines Cosmidklons (cos 111) beschrieben, der mit dem Suchklon mJIul-16 (62) aus der Genbank IIIb erhalten wurde. Dieser Klon erkennt spezifisch die 5'-Flanke des V_KIV-Gensegments. Die Subgruppe IV ist durch ein einziges Gensegment innerhalb der V_K-Multigenfamilie vertreten (62).
Von dem Cosmidklon cos 111 wurde eine Restriktionskarte erstellt. Außer dem kanonischen Satz von Restriktionsnukleasen (vgl. 2.3.) wurde für die Kartierung dieses Cosmidklons zusätzlich die Restriktionsnuklease Eco RI verwendet, um einen besseren Vergleich der Karte dieses Cosmids mit den Restriktionskarten zweier λ-Phagenklone zu ermöglichen, die von H.G. Klobeck mit derselben Probe (mJIuL-16) aus einer Phagenbank isoliert wurden (62). Diese Phagengenbank wurde ausgehend von der DNA eines anderen Individuums (Plazenta-DNA-AF) etabliert. Im überlappenden Bereich konnten keine Spaltstellenunterschiede zwischen dem Cosmidklon cos 111 und den beiden Phagenklonen (λAF1 und λAF2, vgl. (62)) festgestellt werden.
Bei der Analyse elektrophoretisch aufgetrennter Restriktionsfragmente von cos 111 durch Hybridisierung mit einer V_KIV-Genprobe (mJIV-1), konnte neben dem V_KIV-Gensegment eine weitere schwach hybridisierende Region nachgewiesen werden. Durch vergleichende Hybridisierungsversuche mit verschiedenen V_K-Genproben (m1-3, m607V-3, m41V-7) konnte gezeigt werden, daß es sich dabei um ein V_K-Gensegment der Subgruppe III handelt.
Ein weiteres Gensegment konnte durch W. Lorenz (72) innerhalb des Cosmids cos 111 lokalisiert werden. Dies war mit einem Suchklon möglich, der von J. Stavnezer zur Verfügung gestellt wurde und ein V_K-Gensegment enthält, welches sich hinsichtlich seiner Nukleotidsequenz stark von den bisher definierten 4 V_K-Subgruppen unterscheidet (73). Die Lage dieses Gensegments (V_KV) innerhalb der Restriktionskarte von cos 111 ist in Abbildung 9 dargestellt. Die durch cos 111 definierte Region erhielt die Bezeichnung B-Region.

2.3.5. Charakterisierung von Cosmidklonen der T-Region

Von den 31 Isolaten, die mit V_KII-Suchklonen aus den Genbanken IIIb, IVa und IVb erhalten wurden, ließen sich zwei Cosmidklone keiner der bereits definierten Regionen des V_K-Locus zuordnen. Der von diesen Cosmiden (cos 206 und cos 209) abgedeckte Bereich wurde als T-Region bezeichnet (vgl. 2.2.2.).
Für die Kartierung dieser beiden Cosmidklone wurden zusätzliche Restriktionsnukleasen verwendet (cos 206: Bst EII, Hpa I; cos 209 Sac I). Zur Ermittlung der Spaltstellenabfolge beim Cosmidklon cos 206 wurde, neben analytischen Einzel- und Doppelspaltungen, die Partialverdautechnik angewendet (siehe Kapitel 2.3.). Dazu wurde die Cosmid-DNA mit der Restriktionsnuklease Cla I linearisiert und partiell mit den Nukleasen Bgl II, Bam HI, Hpa I, Bst EII, Kpn I sowie Sma I in getrennten Ansätzen partiell verdaut. Die elektrophoretisch aufgetrennten Produkte wurden auf Membranfilter transferiert und durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter M13 mp9-DNA indirekt endmarkiert. Die aus diesen Informationen erhaltene Restriktionskarte ist in Abbildung 9 dargestellt.
Der Cosmidklon 206 enthält 5 V-Gensegmente, die in auffallend regelmäßigem Abstand über die Gesamtregion verteilt sind.
Die Orientierung des V_KIII-Gens konnte mit Hilfe des M13-Klons m120-11 durch Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente von cos 206 ermittelt werden. Der Suchklon m120-11 enthält ein kloniertes DNA-Segment aus der 3'-Flanke des V_KIII-Gens aus der Region Chr22 (58).
Die T-Region zeigt auffällige Homologien zur Region Chr22 hinsichtlich der Abfolge der Restriktionsspaltstellen sowie dem Abstand und der Subgruppe der einzelnen Gene. Der vergleichbare Teil beider Karten umfaßt 3 Gene der Region Chr22. Es wurde bereits erwähnt, daß die Struktur Chr22 auf dem menschlichen Chromosom 22 lokalisiert werden konnte (58). Die strukturelle Beziehung zwischen beiden Regionen soll durch die Konstruktion diskriminierender Subklone untersucht werden, die unterschiedliche Restriktionsfragmentgrößen in beiden Regionen erkennen (70, 71). Mit Hilfe eines solchen Subklons wäre auch die chromosomale

Lokalisierung der Region-T durch Analyse der DNA's von somatischen Zellhybriden (Mensch/Nager) möglich. Es erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, daß eine so komplexe Struktur (5 V_K-Gensegmente, 40 kb) während der Evolution aus dem Verband der Multigenfamile heraus auf andere Chromosomen transponiert worden ist. Der Cosmidklon cos 209, dessen Restriktionskarte ebenfalls in Abbildung 9 dargestellt ist bestätigt im wesentlichen die strukturellen Daten, die für das Cosmid cos 206 ermittelt wurden. Große Teile der dargestellten Restriktionskarte sind jedoch für strukturelle Aussagen nicht verwertbar, da bei diesem Cosmid 2 Vektormoleküle (pHC 79, Cla I linearisiert) artifiziell mit zwei Human-DNA-Fragmenten verknüpft worden sind. Die Entstehung eines derartigen Konstrukts im Ligierungsansatz ist durch die Anwendung des in Kapitel 2.1.1. beschriebenen Konstruktionsprinzips weitgehend ausgeschlossen. Wahrscheinlicher ist eine Erzeugung der Struktur durch ein Rekombinationsereignis in E. coli. Die Lage beider Vektorkopien wurde durch Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente von cos 209 mit radioaktiv markierter pHC 79-DNA ermittelt.

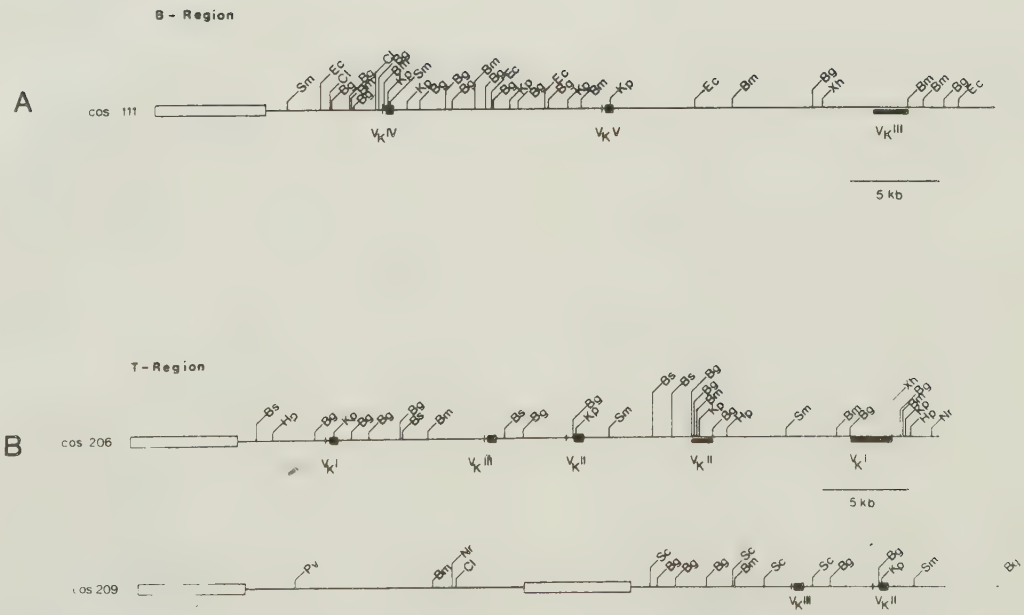

A
B - Region
cos 111
Sm
Ec
Cl
Bg
Bm
Kp
Sm
Kp
Bg
Bm
Ec
Kp
Bm
Kp
Ec
Bm
Bg
Xh
Bm
Bm
Bg
Ec
V_K IV
V_K V
V_K III
5 kb
B
T - Region
cos 206
Bs
Hp
Bg
Kp
Bg
Bg
Bs
Bm
Bs
Bg
Kp
Bg
Sm
Bs
Bs
Bg
Bm
Kp
Bg
Hp
Sm
Bm
Bg
Xh
Bg
Bm
Kp
Hp
Nr
V_K I
V_K III
V_K II
V_K II
V_K I
5 kb
cos 209
Pv
Bm
Nr
Cl
Sc
Bg
Bg
Bg
Sc
Bm
Sc
Sc
Bg
Bg
Kp
Sm
V_K III
V_K II

Abb.9 Restriktionskarten der Regionen B und T

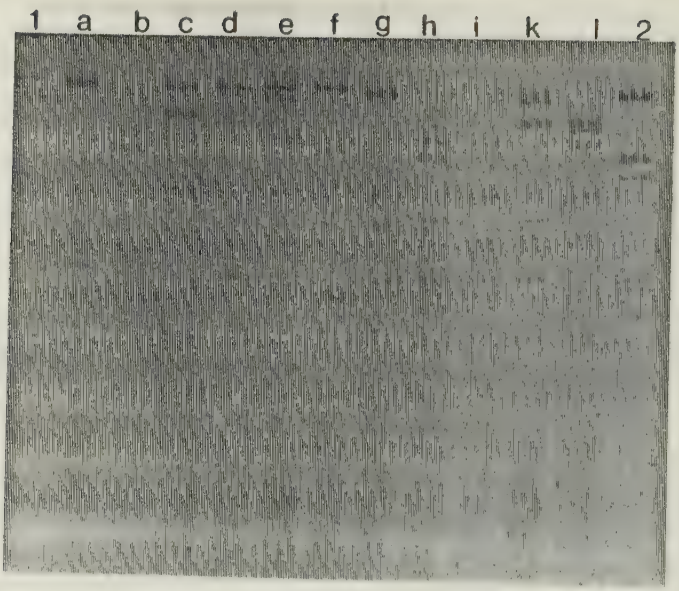
A.) Restriktionskarte der B-Region (cos 111)
cos 111 wurde mit der SubgruppeIV-spezifischen Probe mJIul-16 (62) isoliert.

B.) Restriktionskarte der T-Region
Die Cosmidklone cos 206 und cos 209 wurden mit den Subgruppe II-spezifischen Proben m607V-3 und m106-1 isoliert.

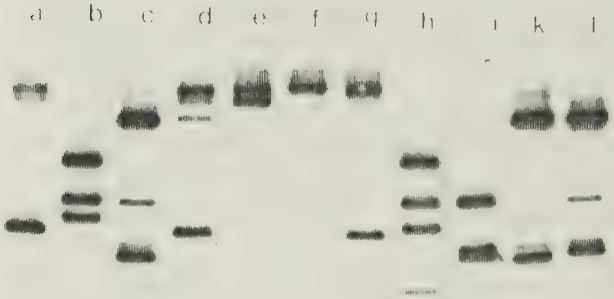
Die für die Restriktionsnukleasen verwendeten Symbole sind am Ende der Arbeit (Abkürzungen und Erläuterungen) erklärt.

2.4. Extendierung der Regionen W und O mit spezifischen Suchklonen

Um einen Einblick in die strukturelle Organisation möglichst großer, zusammenhängender Regionen des menschlichen V_K-Locus zu erhalten, wurden Versuche unternommen, Cosmidklone aus der Genbank IIIb zu isolieren, die die Regionen W und O erweitern. Dazu war es zunächst notwendig, DNA-Segmente aus den terminalen Bereichen der in Abbildung 6 und 7 dargestellten Regionen zu klonieren, die eine möglichst spezifische Erkennung der betreffenden Region bei der Analyse von Cosmidgenbanken gewährleisten.
Vor der gezielten Klonierung eines DNA-Fragments mußten für jeden interessierenden Bereich zunächst die Restriktionsfragmente lokalisiert werden, welche mittelrepetitive DNA-Sequenzen tragen. Dies ist durch folgende Technik möglich: Hybridisiert man auf Membranfiltern immobilisierte DNA-Fragmente mit ^{32}P-markierter menschlicher-DNA, wird man nur dann im Autoradiogramm ein Signal erhalten, wenn die betreffende Sequenz in mehreren Kopien (über 500) in der genomischen-DNA repräsentiert ist (74).



A



B

Abb.10 Nachweis repetitiver Sequenzen auf klonierten Restriktionsfragmenten

A.) Restriktionsanalyse des Cosmidklons cos 143 (O-Region)

Die Cosmid-DNA (je 0,25 µg) wurde mit verschiedenen Restriktionsnukleasen gespalten, auf einem 0,8%-Agarosegel in Gegenwart von Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung photographiert. Die verwendeten Längenstandards (λ-HindIII/EcoRI und λ-HindIII) sind in der Legende von Abb.4 beschrieben. In den einzelnen Bahnen wurden folgende Restriktionsspaltungen aufgetragen: a=BamHI, b=BglII, d=BamHI/SalI, e=SalI/ClaI, f=SalI/PvuI, g=XhoI/BamHI, h=XhoI/BglII, i=SmaI/BglII, k=SmaI/BamHI, l=SmaI/SalI.

B.) Autoradiogramm der Hybridisierung elektrophoretisch aufgetrennter und auf Nitrozellulosefilter transferierter Restriktionsfragmente des Cosmidklons cos 143 mit radioaktiv markierter menschlicher-DNA.

Es wurden jeweils Klone konstruiert, die keine Hybridisierung mit genomischer-DNA zeigten. Die Spezifität der so erhaltenen Suchklone wurde durch weitere Versuche überprüft:

a) Menschliche Plazenta-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsnukleasen gespalten. Die enststandenen Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter transferiert und mit dem radioaktiv markierten Suchklon hybridisiert. Die Anzahl der im Autoradiogramm bei den jeweiligen Spaltungen auftretenden Banden wurde als Maß für die Zahl der genomischen Kopien der Sequenz verwendet.

b) Elektrophoretisch aufgetrennte Restriktionsfragmente aller bisher isolierten Cosmidklone wurden mit den Suchklon-DNA's hybridisiert, um festzustellen, ob homologe Sequenzen innerhalb der bereits charakterisierten Teile des V_K-Locus vorliegen.

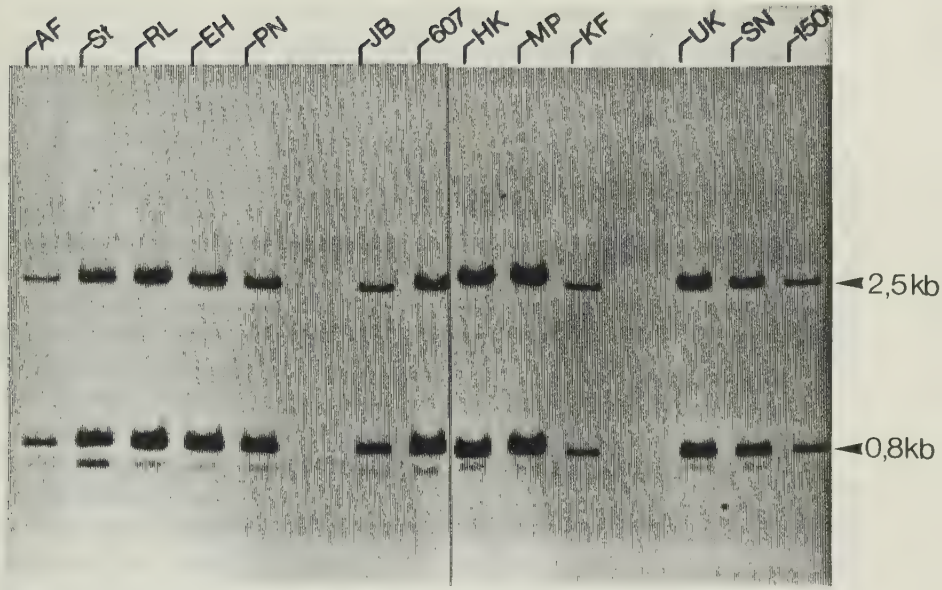
Als Hybridisierungsproben für die Analyse von Cosmidgenbanken wurden nur solche Suchklone verwendet, die eines, oder sehr wenige Restriktionsfragmente unterschiedlicher Größe in genomischer DNA erkennen.

2.4.1. Konstruktion von Extensionssuchklonen der W-Region

Die Cosmidklone cos 166 und cos 167 decken den 5'- bzw. 3'-terminalen Teil der W-Region ab, die in Abbildung 6 dargestellt ist. Die DNA der beiden Klone wurde in der bereits beschriebenen Weise mit radioaktiv markierter genomischer-DNA (menschliche-DNA aus Plazenta) analysiert, mit dem Ziel, repetitive Sequenzen zu kartieren.
Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 11 dargestellt.

Abb.11 Konstruktion von Extensionssuchklonen der W-Region

In Abbildung 11a ist der 5'-terminale Teil der Wa-Region dargestellt (Ausschnitt aus der Restriktionskarte des Cosmidklons cos 166).
Abbildung 11b zeigt einen Ausschnitt aus der Restriktionskarte des Cosmids cos 167, der den 3'-terminalen Teil der Wb-Region repräsentiert.
Restriktionsfragmente, die ein Signal mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA ergaben, sind durch Punkte gekennzeichnet. Offene Balken symbolisieren die Vektoranteile der Cosmidklone.
Subklonierte Restriktionsfragmente sind durch Unterstreichungen gekennzeichnet.



a

b

Abb.12 (Bildlegende umseitig)

Abb.12 Charakterisierung der Extensionssuchklone ml66-1 und ml67-1 durch Analyse Bam HI-gespaltener DNA verschiedener menschlicher Individuen

Für jede Bahn wurden zwischen 10µg und 15µg Bam HI-gespaltene menschliche DNA aufgetragen und in einem 6mm-dicken 0,8%-Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer auf Membranfilter erfolgte die Hybridisierung mit den jeweiligen Proben unter den in der Bildlegende zu Abbildung 19 beschriebenen Hybridisierungsbedingungen (stringente Hybridisierung). Für die verwendeten hochmolekularen DNA's werden dieselben Abkürzungen verwendet wie in der Bildlegende zu Abbildung 19.
Abb.12a Autoradiogramm der Hybridisierung mit der Probe ml67-1
Abb.12b Autoradiogramm der Hybridisierung mit der Probe ml66-1

Aus dem 5'-terminalen Bereich des Cosmids cos 166 wurden drei Restriktionsfragmente isoliert, die kein Hybridisierungssignal mit markierter menschlicher-DNA ergaben. Diese Fragmente wurden in den Vektor M13 mp8 subkloniert. Die Klone ml66-3 und ml66-4 wurden als spezifische Hybridisierungsproben für diesen Teil der W-Region bei der Analyse neu isolierter Cosmide verwendet (siehe Kapitel 2.2.2. und 2.4.2.). Der Subklon ml66-1 wurde auf seine mögliche Eignung als Extensionssuchklon für Cosmidisolierungen untersucht. Dazu wurde menschliche Plazenta-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosefiltern immobilisiert. Bei Hybridisierung dieser Filter mit ^{32}P-markierter ml66-1 DNA erschienen, außer den von der Cosmidkarte her zu erwartenden Restriktionsfragmentgrößen weitere hybridisierende Restriktionsfragmente im Autoradiogramm:

Bei einer Bam HI-Spaltung erkennt der Suchklon ml66-1 neben einer Bande von 0,8 kb, die der Größe des klonierten Bam HI-Fragments entspricht, in genomischer-DNA 4 weitere Fragmente (Größen: 2,2; 2,9; 3,8 und 9,0 kb).
Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Fragmentgrößen zum Teil auf einer allelischen Variation innerhalb der W-Region beruhen (Längenpolymorphismus des Bam HI-Fragments), wurden Bam HI-Spaltungen der DNA's von 12 verschiedenen menschlichen Individuen mit der Probe ml66-1 analysiert. In allen untersuchten Fällen konnten die oben beschriebenen 5 Bam HI-Fragmente nach-

gewiesen werden (siehe Autoradiogramm Abbildung 12a), so daß man davon ausgehen muß, daß das komplexe Erkennungsmuster des Suchklons nicht auf einem Polymorphismus zwischen verschiedenen Allelen der W-Region beruht. Der Suchklon wurde als Hybridisierungsprobe zu Isolierung von extendierenden Cosmidklonen der W-Region verwendet.
Die Konstruktion eines spezifischen Extensionssuchklons für den 3'-terminalen Teil der W-Region erfolgte in analoger Weise: Aus einem nicht repetitiven Bereich des Cosmidklons cos 167 wurde ein Bam HI-Fragment (Größe 0,8 kb) isoliert und in die Bam HI-Stelle des Vektors M13 mp8 inseriert. Der so erhaltene Subklon m167-1 erkennt außer der Fragmentgröße 0,8 kb ein weiteres Bam HI-Fragment der Größe 2,5 kb. Auch für diese Situation konnte gezeigt werden, daß der beobachtete Fragmentgrößenunterschied nicht auf einen individuellen Polymorphismus zwischen verschiedenen Allelen der W-Region zurückzuführen ist. Die entsprechenden Versuche mit Bam HI gespaltener DNA verschiedener menschlicher Individuen sind in Abbildung 12b dargestellt.
Der Suchklon wurde sowohl für Cosmidisolierungen, als auch zur Ermittlung der chromosomalen Lokalisation der W-Region verwendet. Von E. Lötscher wurde die DNA verschiedener somatischer Zellhybridlinien (Mensch/Nager) mit dem Klon m167-1 analysiert (71). Diese Untersuchungen ergaben, daß die Regionen, die vom Suchklon erkannt werden auf dem menschlichen Chromosom 2 lokalisiert sind.

2.4.2. Isolierung und erste Analyse von Cosmidklonen, die die W-Region extendieren

Die Cosmidgenbank IIIb wurde mit den Extensionssuchklonen m166-1 und m167-1 analysiert, um Cosmidklone zu erhalten, die die W-Region in beide Richtungen extendieren.
Mit der Probe m167-1 (Suchklon, 3'-Ende Wa-Region) wurden insgesamt 22 Cosmidklone isoliert. Eine erste Analyse ergab, daß 15 Isolate das im Subklon m167-1 inserierte Bam HI-Fragment (0,8 kb) enthalten, während bei den restlichen 7 Cosmiden ein Bam

HI-Fragment von 2,5 kb mit dem Klon m167-1 hybridisiert, welches bei genomischen Hybridisierungen ebenfalls von diesem Suchklon erkannt wird (vgl. 2.4.1.)
Die Lage der 15 neu isolierten Cosmide relativ zur bisher bekannten Struktur dieses Teils der W-Region (cos 167), wurde durch eine vergleichende Analyse mit Restriktionsnukleasen sowie durch Hybridisierungen mit der Probe m1-3 (V_KI-Suchklon) ermittelt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 13a dargestellt. Der terminale Teil der Wa-Region ist durch eine ungewöhnliche Häufung von Spaltstellen der Restriktionsnuklease Sma I gekennzeichnet. Das Fehlen eines, oder mehrerer dieser diagnostischen Sma I-Fragmente bei den neu isolierten Cosmiden konnte daher als zuverlässiger Indikator für das Ausmaß der durch diese Cosmide erreichten Extension herangezogen werden. Cosmide, die sehr stark mit dem Ausgangsklon cos 167 überlappen, konnten über den Nachweis des V_KI-Gens W3 identifiziert werden. Dieses Gen ergibt bei der Hybridisierung von elektrophoretisch aufgetrennten Pst I-Fragmenten mit der V_KI-Probe m1-3 ein Signal der Fragmentgröße 1 kb (vgl. 2.2.2.). Das V-Gensegment W3 konnte bei 3 Cosmidklonen nachgewiesen werden. Diese Klone überlappen sehr stark mit dem Ausgangscosmid cos 167. Wie aus Abbildung 13a hervorgeht, ist das Ausmaß der Extension der übrigen 12 Cosmide unterschiedlich. Der Klon cos 171 enthält nur noch die beiden terminalen Sma I-Fragmente (2,4 kb und 2,7 kb) des Ausgangscosmids. Dieser Cosmidklon, der die bestehende Struktur mit hoher Wahrscheinlichkeit am weitesten extendiert, wurde daher mit Restriktionsnukleasen kartiert (vgl. 2.4.3.).
Die Restriktionskartierung der 7 weiteren Isolate (2,5 kb Bam HI-Fragment, nachweisbar mit m167-1) ist in Kapitel 2.4.3. beschrieben. Aus dieser Gruppe wurden nach vergleichender Analyse mit Restriktionsnukleasen 2 Cosmide ausgewählt, die nur knapp überlappen. Die somit erhaltene Struktur beinhaltet mit hoher Wahrscheinlichkeit die Restriktionskarten der restlichen Cosmidklone dieses Typs.
Mit der Probe m166-1 wurden 9 Cosmidklone aus der Genbank IIIb isoliert. Trotz des relativ komplexen Hybridisierungsmusters welches der Suchklon bei der Analyse von Restriktionsspaltungen genomischer-DNA ergab (vgl. 2.4.1.), wurde nur ein Cosmidklon

isoliert, der ein Bam HI-Fragment enthält welches in seiner Größe nicht dem subklonierten Fragment der Probe m166-1 entspricht. Dieses Cosmid (cos 195) wurde nicht weiter bearbeitet, da sich auf ihm mit 5 verschiedenen V_K-Genproben (m106-1, m607V-3, m1-3, m41V-7, m21-4) keine V_K-Gensegmente nachweisen ließen.
Die übrigen 8 Cosmidklone zeigten im überlappenden Bereich bei vergleichenden Restriktionsspaltungen mit dem Ausgangscosmid cos 166 eine perfekte Übereinstimmung mit der Wb-Region. Für die Wa-Region wurden mit dem Suchklon m166-1 keine Cosmide erhalten. Dieser bemerkenswerte Befund wird in Kapitel 3.4. diskutiert.

In Abbildung 13 b ist das Ergebnis der ersten Analyse der isolierten Cosmidklone dargestellt. Zur Ermittlung ihrer Lage relativ zum bereits charakterisierten 5'-Ende der Wb-Region (cos 166) wurden die Suchklone m166-3 und m166-4 verwendet. Als weitere Indikatoren wurden die V_K-Gensegmente W7 und W9, sowie ein diagnostisches Sma I-Fragment (1,2 kb) herangezogen (vgl. Abbildung 13b). Die Cosmidklone 196 und 197 überlappen am wenigsten weit mit dem Ausgangscosmid cos 166. Von dem Klon cos 196 wurde daher eine Restriktionskarte erstellt (vgl. 2.4.3.). Mit Suchklonen der V_K-Subgruppen II und III (58) wurden zwei weitere Cosmidklone isoliert, die die Wb-Region extendieren (cos 654 und cos 140). Der von ihnen abgedeckte Bereich kann der Abbildung 14 entnommen werden.

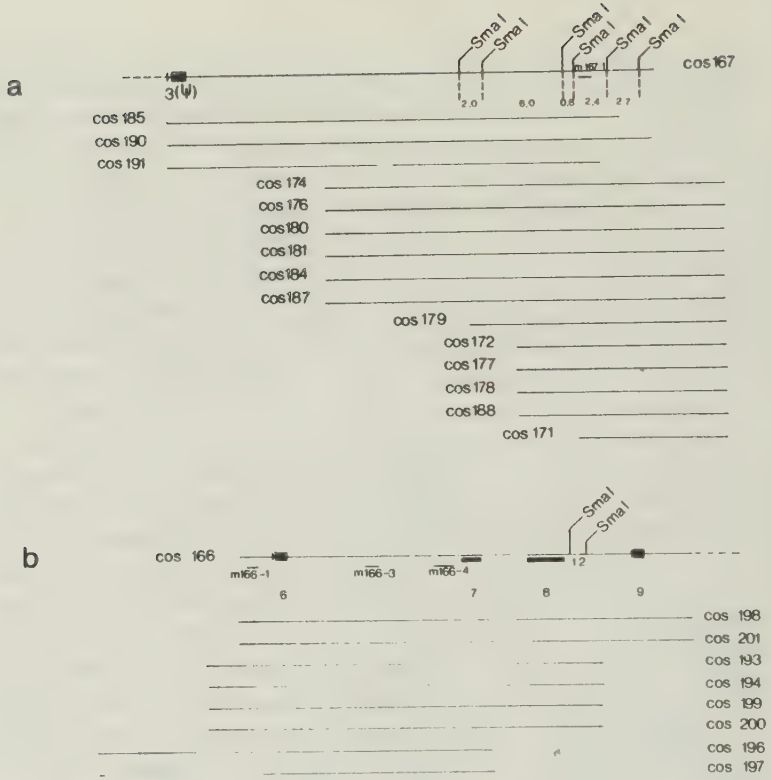


Abb.13 Anordnung von Cosmiden, die mit Extensionssuchklonen der W-Region isoliert wurden

In Abbildung 13a ist die Lage der Cosmidklone dargestellt, die mit dem Suchklon für die Region Wa (cos167) isoliert wurden. Die Größen (kb) von diagnostischen Restriktionsfragmenten sind unterhalb der Restriktionskarte angegeben. Da die Anfangs- und Endpunkte durch die in Kapitel 2.4.2. beschriebene Analyse nicht genau festgelegt werden konnten, sind die Enden der Cosmidklone guppenweise bündig gezeichnet. Extendierende Cosmidklone ragen über das 3'-Ende des Ausgangscosmids cos 167 hinaus. Unter Annahme einer mittleren Cosmidgröße von 45 kb, muß cos 171 als das am weitesten extendierende Cosmid angesehen werden.
In Abbildung 13b ist die Lage von neu isolierten Cosmidklonen relativ zum 5'-Ende der Wb-Region (cos 166) dargestellt. Die Verwendung der Suchklone m166-3 und m166-4 sowie eines diagnostischen Sma I-Fragments ist in Kapitel 2.4.2. beschrieben.

2.4.3. Kartierung von extendierenden Cosmidklonen der W-Region

Aus der Analyse der extendierenden Cosmidklone cos 171 (Wa-Region) und cos 196 (Wb-Region) ergab sich eine Struktur, die in Abbildung 14 zusammenfassend dargestellt ist. Die einzelnen Cosmidklone wurden unter Anwendung der in 2.3. beschriebenen Techniken kartiert.
Entgegen der ursprünglichen Hoffnung mit den verwendeten Suchklonen beide Subregionen (Wa und Wb) sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung zu erweitern, wurden Cosmide, die die W-Region extendieren, nur für die Subregion erhalten, aus denen die Suchklone konstruiert wurden. Der Subklon ml66-1 geht aus einem terminalen Fragment der Wb-Region hervor. Über die Struktur der Wa-Region an dieser Position liegen keine Daten vor. Analoges gilt für den Extensionssuchklon ml67-1.
Aufgrund der großen Zahl isolierter Cosmidklone (insgesamt wurden mit beiden Proben 31 Isolate erhalten) liegt es nahe anzunehmen, daß in der Wa-Region keine Struktur existiert, die von ml66-1 erkannt wird und vice versa in der Region Wb kein homologer Bereich vorliegt, der mit ml67-1 hybridisiert.
Eine mit dem Suchklon ml67-1 isolierte Struktur von 70 kb, die durch die Cosmidklone cos 175 und cos 189 repräsentiert wird, weist keinerlei Homologien mit der Region Wa auf, mit Ausnahme einer gewissen Spaltstellenähnlichkeit in der unmittelbaren Umgebung des mit ml67-1 hybridisierenden Bereichs (ca. 3 kb). Wie bereits erwähnt wurde, konnte nachgewiesen werden, daß diese Struktur auf dem menschlichen Chromosom 2 lokalisiert ist (71). In Abbildung 14 ist diese Region mit der Bezeichnung Wx versehen. Durch Hybridisierung mit Proben für alle V_K-Subgruppen konnte nachgewiesen werden, daß keine V-Gensegmente auf der Wx-Region lokalisiert sind.
Der Cosmidklon cos 171 erweitert die Wa-Region in 3'-Richtung. Auf dem durch seine Restriktionskarte abgedeckten Bereich konnten ebenfalls keine V_K-Gensegmente nachgewiesen werden.
Die Cosmidklone cos 196 und cos 197, die mit dem Suchklon ml66-1 isoliert wurden erweitern die Wb-Region in 5'-Richtung. Dasselbe gilt für zwei Cosmide, die mit V_K-Proben aus Cosmidbanken iso-

liert wurden (cos 140 und cos 654, siehe auch Kapitel 2.2.2.). Diese Cosmidklone extendieren die Wa-Region um 28 kb. In diesem Bereich konnten 2 weitere V_K-Gensegmente nachgewiesen werden: Das V-Gensegment W4 ergab ein deutliches Hybridisierungssignal mit der V_KII-Probe m607V-3 und konnte daher der Subgruppe II zugeordnet werden. Von F.J. Zimmer konnte ein weiteres V-Gensegment (W5) identifiziert und der Subgruppe III zugeordnet werden (70).

Insgesamt konnten innerhalb der Wb-Region 6 V_K-Gensegmente nachgewiesen werden, die den innerhalb des V_K-Locus dominierenden Subgruppen I, II und III angehören. Es ergibt sich also das Bild einer "gemischten Gengruppe". Dieses Organisationsmerkmal wurde bei allen bisher untersuchten Teilstrukturen des V_K-Locus beobachtet (vgl. Kapitel 2.3.4., 2.3.5., 2.4.6.; sowie Zitate (51, 63)).
Die V-Gensegmente sind in Abständen von 5-7 kb entlang der W-Region angeordnet, mit Ausnahme eines größeren intragenischen Bereichs (ca. 15 kb) zwischen den V_K-Gensegmenten W6 und W7. Für die V_K-Gensegmente der Wa-Region gelten hinsichlich ihrer Abstände und der Art der Subgruppe analoge Aussagen. Die Restriktionskarten der Wa- und Wb-Region sind in diesem Bereich außerordentlich homolog. Die Homologie zwischen den Regionen Wa und Wb wird auf der 3'-Seite der V-Gensegmente W3 und W9 durch einen Abschnitt von ca. 3 kb unterbrochen (siehe Abbildung 6 oder 14a). Für diesen Bereich gibt es in der Region Wb keine homologe Struktur. Der strukturelle Unterschied zwischen beiden Regionen kann an dieser Stelle durch ein Deletions- bzw. Insertionsereignis erklärt werden. Zur Kartierung dieses Strukturunterschieds waren Hybridisierungsversuche von F.J. Zimmer (77) hilfreich.

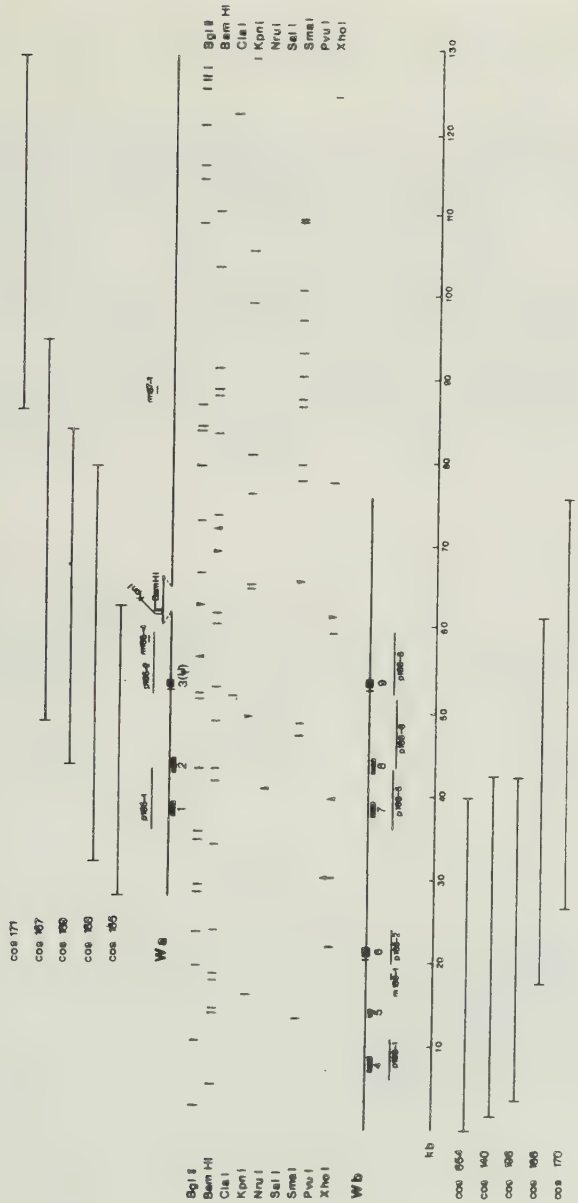


Abb.14a (Bildlegende umseitig)

Abb.14a Gesamtdarstellung der W-Region

Die Darstellung beschreibt die extendierte W-Region. Die verwendete Symbolik ist dieselbe wie in Abbildung 6. Subklonierte Bereiche sind durch Unterstreichungen gekennzeichnet. Von den mit Extensionssuchklonen ml67-1und ml66-1 isolierten Cosmidklonen sind die jeweils am weitesten extendierenden Vertreter (cos 171 und cos 196) eingezeichnet. Die Lage weiterer Cosmidklone kann aus Abbildung 13 entnommen werden. Die Cosmidklone cos 654 und cos 140 wurden mit Suchklonen für die Subgruppen II und III isoliert. Die übrigen eingezeichneten Cosmidklone wurden mit der Probe ml-3 (Subgruppe I) isoliert. Die Lage weiterer Cosmidklone, die mit V-Proben, oder sonstigen Suchklonen isoliert wurden geht aus Tabelle 6 hervor und wird in Verbindung mit Abbildung 6 verständlich.
Die V-Gensegmente W4 und W5, die bei der Extension der Region Wb in 5'-Richtung identifiziert wurden gehören den Subgruppen II bzw. III an.

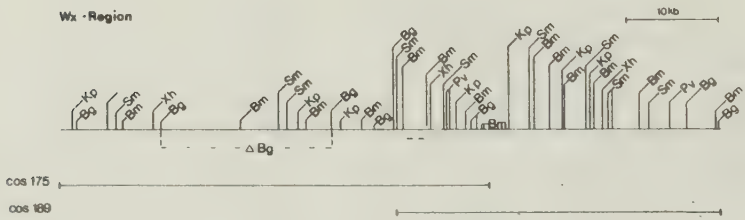


Abb.14b Restriktionskarte der Region Wx

Die Cosmidklone cos 175 und cos 189 wurden mit dem Extensionssuchklon ml67-1 isoliert.
Symbolik:·—·—·—=Restriktionsfragment (Bam HI; 2,5 kb), welches mit ml67-1 hybridisiert.
Die Abkürzungen für Restriktionsnukleasen sind am Ende der Arbeit (7. Abkürzungen und Erklärungen) erläutert.

2.4.4. Konstruktion von Extensionssuchklonen der O-Region

Die Cosmidklone cos 143 und cos 144, die mit der V_KI-Probe m1-3 aus der Genbank IIIa isoliert wurden definieren eine Region von 45 kb (O-Region), deren Restriktionskarte in Abbildung 7 dargestellt ist.
Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Cosmidklone isoliert und charakterisiert, die die O-Region in beide Richtungen extendieren. Nach der in Kapitel 2.4. beschriebenen allgemeinen Strategie wurden zunächst repetitive Elemente auf den Restriktionsfragmenten beider Cosmidklone lokalisiert, mit dem Ziel, aus nicht-repetitiven Bereichen Subklone zu erhalten, die die 5'- und 3'-Termini der O-Region in Hybridisierungsexperimenten spezifisch erkennen.
In Abbildung 15a sind Versuche zur Konstruktion eines Extensionssuchklons für den 3'-Teil der O-Region schematisch zusammengefasst. Aus dem Cosmidklon cos 143 wurde ein Bam HI-Fragment (Größe: 0,8 kb) isoliert und in den Vektor M13 mp8 inseriert. Der resultierende Suchklon m143-1 wurde hinsichtlich seiner Spezifität für die O-Region überprüft: Mit radioaktiv markierter m143-1 DNA wurden elektrophoretisch aufgetrennte und auf Membranfiltern immobilisierte Restriktionsspaltungen von menschlicher Plazenta-DNA hybridisiert. Der Suchklon m143-1 erkennt bei Spaltungen mit den verwendeten Restriktionsnukleasen Bam HI, Bgl II, Eco RI und Kpn I jeweils nur eine Fragmentgröße, die der Größe des betreffenden Restriktionsfragments im Klon cos 143 entspricht. Von allen, bis zu diesem Zeitpunkt isolierten Cosmidklonen, wurde nur cos 143 in Hybridisierungen mit radioaktiver m143-1 DNA erkannt. Diese Daten weisen auf eine hohe Spezifität des Klons m143-1 für die O-Region hin.
Aufgrund seiner eindeutigen Hybridisierungseigenschaften wurde der Suchklon m143-1 von E. Lötscher verwendet, um die chromosomale Lokalisierung der O-Region zu überprüfen:
Hybridisierungsversuche mit den DNA's verschiedener somatischer Zellhybridlinien (Mensch/Nager) ergaben eine klare Zuordnung der O-Region zum menschlichen Chromosom 2 (71).

In Abbildung 15b sind die Versuche zur Konstruktion eines Extensionssuchklons für den 5'-Teil der O-Region schematisch wiedergegeben. In diesem Bereich war es nicht möglich ein spezifisches Restriktionsfragment direkt aus der Cosmid-DNA zu klonieren, da alle Fragmente ein Hybridisierungssignal mit radioaktiv markierter menschlicher-DNA ergaben. Daher wurde zunächst ein randständiges Restriktionsfragment (Kpn I/Sal I; 3,3 kb; siehe Abbildung 15b) isoliert und in den Vektor M13 mp19 inseriert. Die DNA des erhaltenen rekombinanten Phagenklons (m144-1) wurde dann mit häufiger spaltenden Restriktionsenzymen analysiert, mit dem Ziel, die mittelrepetitiven Sequenzen in diesem Bereich der Cosmidkarte näher einzugrenzen. Durch Hybridisierung der Restriktionsfragmente mit radioaktiv markierter Human-DNA konnte ein repetitives Element in diesem Bereich innerhalb einer Region von 400 bp lokalisiert werden. Daraufhin wurde aus einem nichtrepetitiven Anteil des subklonierten DNA-Segments ein Rsa I-Restriktionsfragment (0,4 kb) isoliert und in den Vektor M13 mp7 eingebaut (m144-2, vgl. Abbildung 15b). Rsa I erzeugt Fragmente mit glatten Enden. Daher wurde das isolierte Restriktionsfragment vor dem Einbau in den Phagenvektor mit synthetischen Sal I-Linkern versehen (vgl. 4.2.9.), um nach einer präparativen Isolierung aus der DNA des Klons m144-2 ein Fragment mit überhängenden Enden zu erhalten. Fragmente mit überhängenden Enden eignen sich besser zur Präparation konkatemerer Hybridisierungsproben, wie sie für die Analyse von Cosmidgenbanken verwendet wurden (vgl. Kapitel 2.2.1.).
Der Subklon m144-2 erwies sich als spezifisch für den 5'-terminalen Teil der O-Region: Bei Hybridisierungsversuchen mit elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmenten aus menschlicher Plazenta-DNA erkennt m144-2 jeweils nur eine Fragmentgröße, die sich in jedem Fall einem kartierten Restriktionsfragment im Cosmidklon cos 144 zuordnen läßt. Bei Hybridisierungen der DNA's aller Cosmidklone, die mit V_K-Proben isoliert wurden, mit m144-2 als Hybridisierungsprobe, ergab nur die DNA des Klons cos 144 ein Hybridisierungssignal.

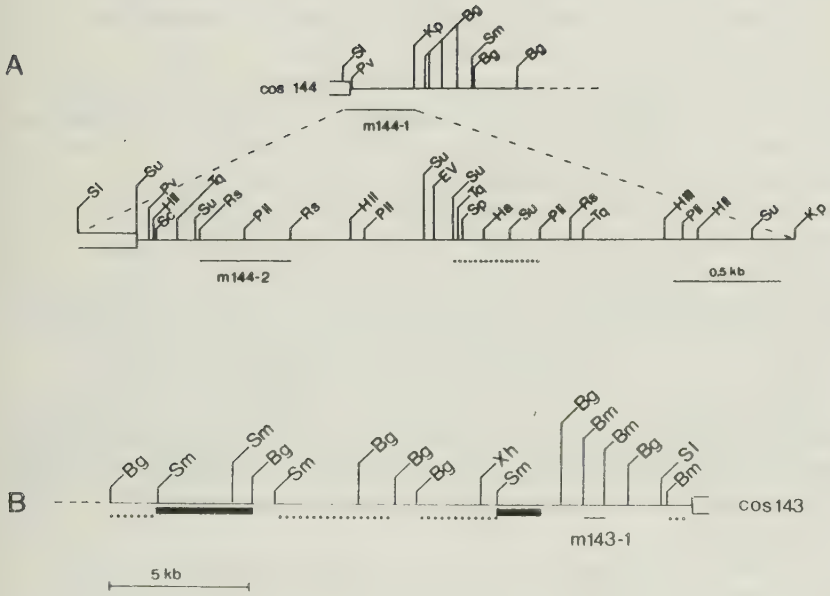


Abb.15 Konstruktion von Extensionssuchklonen der O-Region

A.) Dargestellt ist der 5'-terminale Teil der O-Region (cos 144). Repetitive Bereiche sind durch Punkte gekennzeichnet. Die Konstruktion des Subklons m144-1, sowie des Extensionssuchklons m143-2 ist in Kapitel 2.4.4. beschrieben.
Die Abkürzungen für Restriktionsnukleasen sind am Ende der Arbeit (7. Abkürzungen und Erläuterungen) erklärt.

B.) Dargestellt ist der 3'-terminale Teil der O-Region (cos143). Die Konstruktion des Extensionssuchklons m143-1 ist in Kapitel 2.4.4. beschrieben.

2.4.5. Isolierung von extendierenden Cosmidklonen der O-Region

Die Cosmigenbanken IIIb und IIIc wurden mit den Extensionssuchklonen m143-1 und m144-2 analysiert, um Cosmidklone zu erhalten, die die O-Region in beide Richtungen extendieren.

Mit der Probe m143-1 (Suchklon 3'-Ende, O-Region) wurden insgesamt 6 Cosmidklone aus der Genbank IIIb isoliert. Nach Analyse der Genbank IIIc mit dem Klon m144-2 (Suchklon 5'-Ende, O-Region) wurden 4 Cosmidklone erhalten.
In Abbildung 16 ist die erste Analyse der erhaltenen Isolate schematisch dargestellt. Durch vergleichende Restriktionsspaltungen mit der Restriktionsnuklease Sma I konnte das Ausmaß der Überlappung der neu isolierten Cosmide mit der bisherigen Restriktionskarte der O-Region ermittelt werden. Aufgrund der diagnostischen Sma I-Fragmente konnten 3 Cosmidklone identifiziert werden, die die O-Region in 3'-Richtung erheblich extendieren (cos 147, cos 149 und cos 146). Die Cosmidklone 146 und 149 erwiesen sich als nahezu identisch. Die Kartierung der Klone cos 146 und cos 147 ist in Kapitel 2.4.6. beschrieben.

Unter den Cosmidklonen, die mit dem Extensionssuchklon m144-2 (5'-terminaler Bereich, O-Region) isoliert wurden, konnte ein rekombinantes Cosmid (cos 151) identifiziert werden, welches das durch cos 144 definierte 3'-Ende der O-Region um mehr als eine halbe durchschnittliche Cosmid-Insertlänge (20 kb) erweitert. Die Restriktionskartierung dieses Cosmidklons (cos 151) ist in Kapitel 2.4.6. beschrieben. Zwei weitere Cosmidklone, die diesen Bereich der O-Region nur mäßig extendieren (6-10 kb), erwiesen sich als nahezu identisch. Der Cosmidklon cos 152 ergab bei Restriktionsspaltungen (Bgl II, Bam HI und Sma I) eine Fragmentgrößenverteilung, die völlig dem Klon cos 144 entspricht, aus dem der Suchklon m144-2 erhalten wurde. Beide Klone (cos 152 und cos 144) sind nach Maßgabe dieser Analyse als identisch zu betrachten.

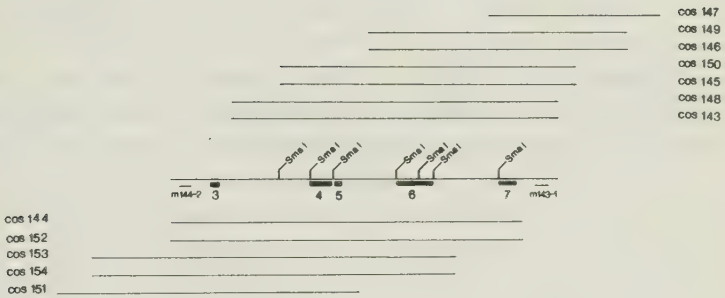


Abb.16 Anordnung von Cosmidklonen, die mit Extensionssuchklonen der O-Region isoliert wurden

Dargestellt ist die Anordnung neu isolierter Cosmidklone relativ zu der, durch die Cosmide cos 143 und cos 144 definierten Struktur (O-Region). Die verwendeten Symbole sind dieselben wie in Abbildung 13.

2.4.6. Restriktionskartierung von Cosmidklonen, die die O-Region extendieren

Die Cosmidklone cos 146, cos 147 und cos 151, die die O-Region in beide Richtungen extendieren wurden mit Restriktionsnukleasen kartiert. Die Restriktionskarten wurden nach Analyse der Cosmid-DNA's mit Einzel- und Doppelspaltungen erstellt. Die Lage zusätzlicher V_K-Gensegmente in den extendierenden Bereichen wurde durch Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente mit den bereits mehrfach vorgestellten Proben für verschiedene V_K-Subgruppen ermittelt. Für jeden Cosmidklon wurde die Spaltstellenabfolge zusätzlich durch Partialspaltungen der linearisierten Cosmid-DNA's mit

anschließender indirekter Endmarkierung bestimmt, um die Analyse der durch Einzel- und Doppelspaltungen ermittelten Struktur zu bestätigen, oder an unsicheren Stellen zu ergänzen (vgl. 2.3.)

Insgesamt ergab sich das in Abbildung 17 dargestellte Bild der O-Region. In 5'-Richtung wurde eine Extension von etwa 20 kb erreicht. In diesem Teil konnten zwei V_K-Gensegmente nachgewiesen werden, von denen eines der Subgruppe I, das andere der Subgruppe II angehört (Gensegment O1 bzw. O2 in Abbildung 17). Beide Gensegmente liegen etwa 10 kb auseinander.

Die Restriktionskarten der Cosmidklone, die mit dem Suchklon m143-1 isoliert wurden (3'-Teil, O-Region) ergeben ein komplexes Bild: Die Restriktionskarte des Klons cos 146 stimmt im überlappenden Bereich (22 kb) völlig mit dem Cosmidklon cos 143 überein, aus dem der Suchklon konstruiert wurde. Im extendierenden Bereich konnten drei V_K-Gensegmente nachgewiesen werden (O8 Subgruppe I, O9 Subgruppe I und O10 Subgruppe III). Die Restriktionskarte des zweiten, potentiell extendierenden Cosmidklons für diesen Bereich der O-Region (cos 147) ist im überlappenden Bereich (8 kb) ebenfalls mit cos 143 identisch.
Jenseits des mit cos 143 überlappenden Abschnitts unterscheiden sich die Restriktionskarten beider Cosmidklone. Auch im potentiell extendierenden Teil des Cosmidklons cos 147 konnte ein weiteres V-Gensegment nachgewiesen werden (O15 Subgruppe I), welches noch im homologen Teil der Restriktionskarten beider extendierender Cosmidklone liegt. Jenseits der 3'-Flanke dieses Gensegments bricht die Spaltstellenhomologie zwischen beiden Cosmidklonen ab. Für die Gensegmente O9 und O10 in cos 146 gibt es in cos 147 keine Entsprechung.
Versuche zur Klärung der erhaltenen Situation für diesen Teil der O-Region sind in Kapitel 2.6. beschrieben.
Die Abstände der V_K-Gensegmente innerhalb der O-Region unterscheiden sich stärker als in den Regionen, deren Charakterisierung bereits beschrieben wurde (Regionen:W, T und B).
Auffällig ist die enge Abfolge der Gensegmente O4 und O5 (Abstand 1,5 kb), sowie O9 und O10 (Abstand 1 kb). Zwischen den Gensegmenten O3 und O4 sowie zwischen den Gensegmenten O8 und O9

befinden sich größere Abschnitte, auf denen keine Restriktionsfragmente nachgewiesen werden konnten, die mit den verwendeten V_K-Proben ein Hybridisierungssignal ergaben. Dasselbe gilt für den DNA-Bereich zwischen den Gensegmenten 06 und 07. Auf der 3'-Seite des Gens 015 (cos147) konnte über einen Bereich von 30 kb kein weiteres V_K-Gensegment nachgewiesen werden. Die übrigen Gensegmente sind durch intragenische Abschnitte von jeweils etwa 9 kb getrennt.

Für die Zugehörigkeit der Gensegmente zu den einzelnen V_K-Subgruppen innerhalb der O-Region ergibt sich qualitativ das gleiche Bild, das für die anderen Teilstrukturen des menschlichen V_K-Locus erhalten wurde (vgl. Kapitel 2.3.4.). Die in Abbildung 17 dargestellten 12 V-Gensegmente der O-Region gehören den innerhalb des V_K-Locus dominierenden 3 Subgruppen (V_KI,V_KII und V_KIII) an. Ein Ordnungsprinzip, welches auf ein einfaches Amplifikationsschema während der Evolution schließen ließe, ist nicht erkennbar.

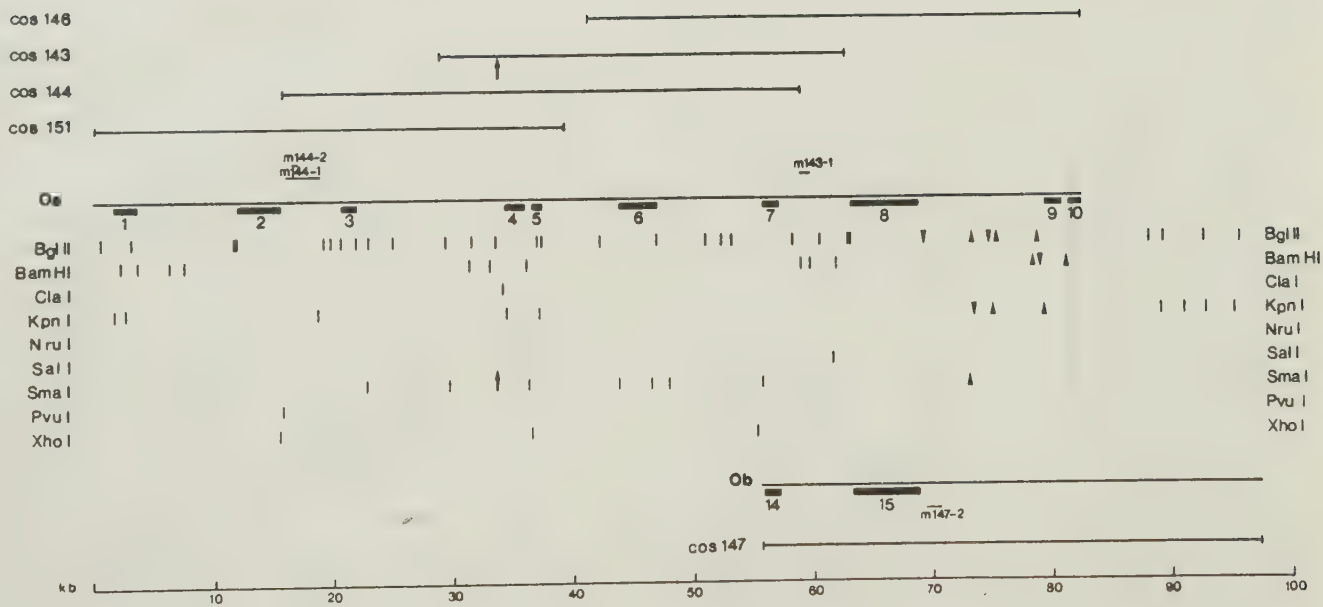

cos 146
cos 143
cos 144
cos 151
m144-2
m144-1
m143-1
Os
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Bgl II
Bam HI
Cla I
Kpn I
Nru I
Sal I
Sma I
Pvu I
Xho I
Ob
14
15
m147-2
cos 147
kb
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

Abb.17 Gesamtdarstellung der O-Region

Die Darstellungsweise für die O-Region ist dieselbe, wie sie auch für die Region W (Abbildung 6 und 14a) verwendet wurde.
Die Lage der V-Gensegmente O3 und O8 ergibt sich aus Hybridisierungsdaten von A. Meindl (77).
Die einzelnen V-Gensegmente gehören folgenden Subgruppen an: 1-Subgr.II, 2-Subgr.I, 3-Subgr.II, 4-Subgr.I, 5-Subgr.II, 6-Subgr.I, 7-Subgr.III, 8-Subgr.I, oder Subgr.III (77), 9-Subgr.I, 10-Subgr.III, 14-Subgr.III, 15-Subgr.I, oder Subgr.III (77).

2.5. Eingehende Analyse der W-Region

In diesem Kapitel werden Versuche beschrieben, in denen verschiedene strukturelle Aspekte der W-Region näher analysiert wurden.Im einzelnen wurde folgenden Fragen nachgegangen:

a) Sind die V_K-Gensegmente innerhalb der W-Region in gleicher Polarität angeordnet?
b) Ist die Aufspaltung der W-Region in zwei Subregionen (Wa und Wb) durch das Vorliegen zweier Allele zu erklären, oder auf ein Duplikationsereignis innerhalb des V_K-Locus zurückzuführen?

2.5.1. Orientierung von V_K-Gensegmenten innerhalb der W-Region

Eine unterschiedliche Orientierung der V_K-Gensegmente in der Keimbahnanordnung wird im Zusammenhang mit einem Modell für die V-J Rekombination diskutiert ((75), siehe auch Kapitel 3.3.). Vor allem vor diesem mechanistischen Hintergrund wurden in unserer Arbeitsgruppe Versuche unternommen, die Orientierung der V-Gensegmente in den durch Restriktionskartierung charakterisierten Regionen des V_K-Locus zu ermitteln.

Für diese Untersuchungen stehen im Prinzip zwei Methoden zur Verfügung:

1.) Ermittlung der Nukleotidsequenz der V-Gensegmente

2.) Feinkartierung der Genregion einschließlich der 5'- und 3'-Flankenbereiche mit häufig spaltenden Restriktionsnukleasen und Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente mit radioaktiv markierten Proben für die 5'-und 3'-Anteile von bereits charakterisierten V_K-Gensegmenten.

Die Orientierung einiger V_K-Gensegmente innerhalb der, für die W-Region erstellten Restriktionskarte wurde mit der zweiten Methode ermittelt. Dazu wurden zunächst größere Restriktionsfragmente, die die einzelnen Gensegmente einschließlich der 5'- und 3'-Flanken enthalten durch präparative Gelelektrophorese aus den jeweiligen Cosmidklonen isoliert und in den Plasmidvektor pBR 322 inseriert (siehe Tabelle 7). Die so erhaltenen rekombinanten Plasmide wurden feinkartiert. In Abbildung 18 sind die Restriktionskarten dieser Subklone dargestellt.
Die Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente aus den feinkartierten Bereichen der W-Region ergaben, daß die untersuchten Gensegmente W1, W2 und W3, sowie W6, W7, W8 und W9, in gleicher Polarität innerhalb der jeweiligen Region angeordnet sind.
Dieses Bild ergab sich auch für andere bisher untersuchte Regionen des V_K-Locus (51, 57).

Cosmid	Subklon	Fragment (Größe)	eingebaut in pBR322	V-Gen (Subgr.)	5'-Probe	3'-Probe
cos166	p166-2	BglII/ BglII (4,2kb)	BamHI/BamHI	W6 (I)	m1L-3	m1V-1
cos166	p166-5	BglII/ BglII (7,9kb)	BamHI/BamHI	W7 (II)	m6410-L	m607V-3
cos166	p166-6	BglII/ BglII (8,4kb)	BamHI/BamHI	W8 (II)	m6410-L	m607V-3
cos166	p166-8	ClaI/ XhoI (7,2kb)	ClaI/SalI	W9 (I)	m1L-3	m1V-1
cos165	p165-1	BglII/ BglII (7,9kb)	BamHI/BamHI	W1 (II)	m6410-L	m607V-3
cos165	p165-2	ClaI/ XhoI (7,2kb)	ClaI/SalI	W3	m1L-3	m1V-1

Tabelle 7 Konstruktionsprinzip der Subklone, die die Gensegmente W1, W3, W6, W7, W8 und W9 enthalten.

Die Hybridisierungsproben, die zur Festlegung der 5'- und 3'-Bereiche der einzelnen Gensegmente verwendet wurden, sind in Tabelle 8, Kapitel 4.1.2 beschrieben. Die Lage der subklonierten Bereiche innerhalb der W-Region geht aus Abbildung 14 hervor.

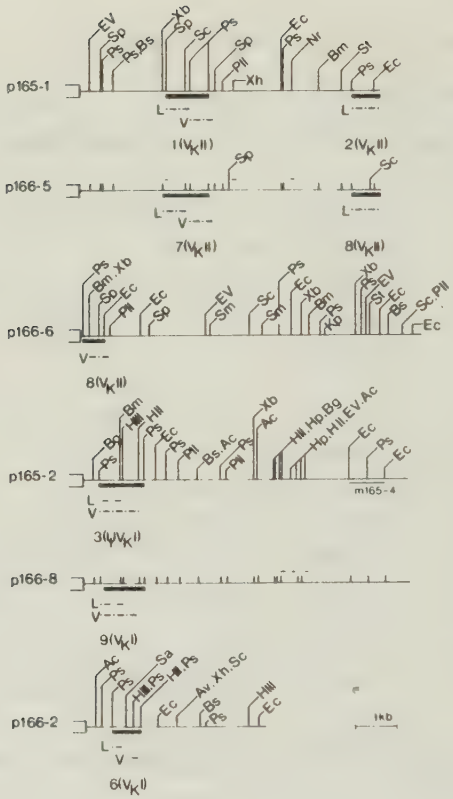


Abb.18 Orientierung der V_K-Gensegmente W1, W3, W6, W7, W8 und W9 innerhalb klonierter Restriktionsfragmente der W-Region

Dargestellt sind die Restriktionskarten von 6 rekombinanten Plasmiden, die V-Gensegmente der W-Region enthalten. Die Lage der subklonierten Bereiche innerhalb der Region, kann der Übersichtskarte (Abbildung 14) entnommen werden.
Bereiche, die mit 5'(L)- und 3'(V)-Proben hybridisieren, sind durch alternierende Striche und Punkte gekennzeichnet. Die 5'- und 3'-Proben für die einzelnen Subgruppen sind in Kapitel 4.1.2. (Tabelle 8) aufgeführt. Zu Region Wa homologe Spaltstellenpositionen sind bei Plasmiden aus der Region Wb durch senkrechte Striche angedeutet. Spaltstellenunterschiede werden besonders hervorgehoben:

— =Spaltstellen, die in Teilregion Wb nicht vorhanden sind; zusätzliche Spaltstellenpositionen in Wb werden in der für Wa benutzten Symbolik wiedergegeben.
In der Restriktionskarte von p165-2 ist ein Restriktionsfragment gekennzeichnet, welches in M13 mp7 subkloniert wurde (m165-4). Die Verwendung des erhaltenen Suchklons ist in Kapitel 2.5.2. beschrieben.

2.5.2. Die strukturellen Unterschiede der Subregionen Wa und Wb können auf ein Duplikationsereignis während der Evolution zurückgeführt werden

Die Charakterisierung von rekombinanten Cosmidklonen der W-Region ergab zwei Strukturen (Wa und Wb, dargestellt in Abbildung 6 und 14), deren Restriktionskarten über eine Distanz von 50 kb ein hohes Maß an Homologie aufweisen. Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten die erhaltenen Daten zu interpretieren:
1.) Die Regionen Wa und Wb stellen allelische Varianten derselben genetischen Region dar.
2.) Die Regionen Wa und Wb befinden sich an verschiedenen Positionen innerhalb der Genkarte des menschlichen V_K-Locus und sind durch Duplikation auseinander hervorgegangen.

Eine Entscheidung zwischen Allelen und duplizierten Genen ist durch Analyse der DNA verschiedener, nicht-verwandter menschlicher Individuen mit einem Suchklon möglich, der bei Hybridisierungen einen diagnostischen Spaltstellenunterschied zwischen beiden Regionen spezifisch erkennt. Der Nachweis eines Restriktionsspaltstellenunterschieds zwischen den Regionen Wa und Wb würde bei Vorliegen einer allelischen Beziehung zwischen beiden Strukturen eine statistische Verteilung zweier Restriktionsfragmente A und B bei der Untersuchung der DNA's verschiedener Individuen erwarten lassen (AA, AB, BB). Für den Fall einer duplizierten Struktur sollten in der DNA jedes untersuchten Individuums beide Fragmentgrößen nachgewiesen werden.

Für die W-Region wurde ein Suchklon konstruiert, der einen Restriktionsspaltstellen-Unterschied zwischen homologen Bereichen beider Subregionen spezifisch erkennt: Die 3'-Flankenbereiche der V-Gensegmente W3 und W9, deren Restriktionskarten in Abbildung 18 dargestellt sind (Plasmide p165-2 und p166-8), unterscheiden sich durch eine Bgl II-Spaltstelle, die 3,5 kb von W3 entfernt ist und an der homologen Position in der Subregion Wb fehlt. In Abbildung 19 sind diese Verhältnisse übersichtlich dargestellt.

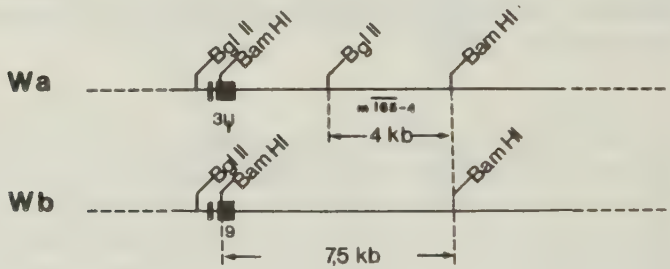


Abb.19 Der Suchklon m165-4 erkennt bei Hybridisierungsexperimenten unterschiedliche Fragmentgrößen in den Subregionen Wa und Wb

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus den Restriktionskarten der Regionen Wa und Wb. Die Restriktionsfragmentgrößen (kb), die vom Subklon m165-4 erkannt werden sind unterhalb der jeweiligen Restriktionskarte angegeben.

Aus einem nicht-repetitiven Bereich auf der 3'-Seite dieser Bgl II-Spaltstelle wurde, ausgehend von der DNA des Plasmids p165-2, ein Eco RI-Fragment isoliert und in den Vektor M13 mp7 inseriert. Der resultierende Suchklon m165-4 wurde als Probe für Hybridisierungsexperimente verwendet. Radioaktiv markierte DNA des Klons m165-4 erkennt bei der Hybridisierung von Restriktionsfragmenten, die aus einer Doppelspaltung von Cosmidklonen aus den Regionen Wa und Wb mit den Restriktionsnukleasen Bgl II und Bam HI hervorgehen, unterschiedliche Fragmentgrößen für die beiden Subregionen (siehe Abbildung 19). Für die Region Wa ist ein hybridisierendes Bgl II-/Bam HI-Fragment von 4 kb charakteristisch, während der

Suchklon ml65-4 ein Bgl II-/Bam HI-Fragment von 7,5 kb innerhalb der Wb-Region erkennt. Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen wurde dieses Erkennungsmuster des Suchklons auch in Bgl II-/Bam H I-Spaltungen von menschlicher- DNA erhalten. Daraufhin wurden hochmolekulare genomische DNA's von 17 menschlichen Individuen mit den Restriktionsnukleasen Bgl II und Bam HI gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Transfer auf Membranfilter mit der Probe ml65-4 hybridisiert. Abbildung 20 zeigt das Autoradiogramm dieser Hybridisierung.

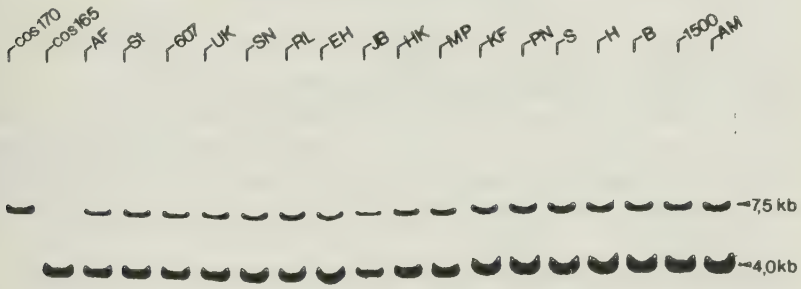


Abb.20 Autoradiogramm der Hybridisierung elektrophoretisch aufgetrennter Restriktionsfragmente von genomischer DNA aus 17 verschiedenen menschlichen Individuen mit dem Suchklon ml65-4

Jeweils 20µg der unterschiedlichen menschlichen DNA's wurden mit den Restriktionsnukleasen Bgl II und Bam HI gespalten. Als Referenz wurden die DNA's der Cosmidklone cos 170 und cos 165 ebenso verdaut. Die Spaltprodukte wurden auf 6mm-dicken 0,8%-Agarosegelen aufgetrennt und auf Membranfilter transferiert. Die Bahnen mit den Referenzcosmiden cos 165 und cos 170 enthielten je 0,1ng gespaltene Cosmid-DNA, sowie je 30µg ultraschallbehandelte Lachs-DNA.
Die Hybridisierung der Filter mit markierter DNA des Phagenklons ml65-4 erfolgte für 12h bei 68°C in 0,6M NaCl; 0.06M Natriumcitrat; 1xDenhardts Lösung (68), 1% SDS, 100µg/ml denaturierter

Lachs-DNA bei einer Probenkonzentration von 10ng/ml. Dekontaminierende Waschschritte wurden bei 68°C mit 15mM NaCl; 1,5mM Natriumcitrat und 1% SDS durchgeführt (hohe Stringenz). Die Autoradiographie erfolgte für 12h mit einer Cawo MRE 600 Verstärkerfolie.
Folgende hochmolekulare DNA's wurden verwendet:
DNA aus menschlicher Plazenta (AF und St)
DNA aus peripherem Blut (UK, SN, RL, EH, JB, HK, MP, KF, PN, AM)
DNA aus einer lymphoblastoiden Zellinie (GM 607)
DNA aus einer Myelom-Zellinie (GM 1500)
DNA aus Leukozyten von Leukämiepatienten (S und B, chronische lymphatische B-Zell-Leukämie; A, akute lymphatische T-Zell-Leukämie)
Die Größen der beiden hybridisierenden Bgl II-Fragmente sind in kb neben dem Autoradiogramm vermerkt.

In allen untersuchten menschlichen DNA's konnten beide Restriktionsfragmente nachgewiesen werden. Dieses Resultat zeigt, daß es sich bei den Strukturen Wa und Wb nicht um verschiedene Allele derselben genomischen Region handelt, sondern, daß beide Subregionen an verschiedenen Orten des menschlichen V_K-Locus lokalisiert sind.
Analoge Resultate wurden auch für andere Teilstrukturen des menschlichen V_K-Locus erhalten (51, 57, 76).

2.6. Nähere Charakterisierung von Strukturen, die bei der 3'-Extension der O-Region erhalten wurden

Die Restriktionskartierung von Cosmidklonen, welche mit dem Extensionssuchklon für den 3'-Teil der O-Region isoliert wurden, ergab zwei unterschiedliche Strukturen (Oa, cos 146 und Ob, cos 147; siehe Kapitel 2.4.6.).
Es galt nun zunächst abzuklären, wie weitgehend der Unterschied zwischen beiden Strukturen (Oa und Ob) ist. Die Frage war: Erkennt ein DNA-Segment aus einer Teilstruktur (z.B. Ob) bei Hybridisierungsexperimenten eine formal entsprechende Position in der anderen Teilstruktur.

Dazu wurde ein Suchklon aus einem nicht-repetitiven Bereich der Region Ob konstruiert. In Abbildung 21 sind diese Versuche schematisch wiedergegeben.

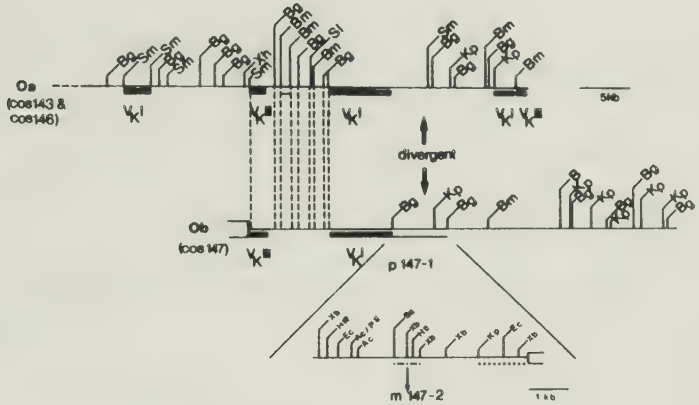


Abb.21 Analyse der strukturellen Divergenz von Cosmidklonen, die den 3'-Teil der O-Region potentiell extendieren

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Restriktionskarte des 3'-Teils der O-Region. Die Restriktionskarten der Cosmidklone cos 143, cos 146 (oberer Teil der Abbildung) und cos 147 (unterer Teil der Abbildung), sind so eingezeichnet, daß homologe Bereiche übereinander liegen. Für die Restriktionsnukleasen in den Cosmidkarten werden dieselben Symbole verwendet, wie in den anderen Abbildungen (Erläuterung im Abkürzungsverzeichnis). Senkrechte unterbrochene Linien kennzeichnen homologe Spaltstellenpositionen.
Im unteren Teil der Abbildung ist die Konstruktion des spezifischen Suchklons m147-2 für die Ob-Region gezeigt: Ein Bgl II-Fragment (5,2 kb) wurde in den Plasmidvektor pBR 322 inseriert. Das resultierende rekombinante Plasmid (p147-1) wurde mit Restriktionsnukleasen feinkartiert. Repetitive Bereiche wurden durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter menschlicher-DNA lokalisiert (Symbol: gepünktelte Linien). Aus einem nicht repetitiven Bereich von p147-1 wurde der Suchklon m147-2 gewonnen (Sau 3A-Restriktionsfragment; 0,7 kb; eingebaut in die Bam HI-Stelle von M13 mp8).

Der erhaltene M13-Phagenklon m147-2 erkennt die Ob-Region spezifisch: Bei nicht stringenter Hybridisierung mit dem Suchklon m147-2 als Probe, kann in elektrophoretisch aufgetrennten und auf Membranfiltern immobilisierten Restriktionsspaltungen von menschlicher-DNA autoradiographisch jeweils nur eine Fragmentgröße nachgewiesen werden, die für alle verwendeten Restriktionsenzyme einem in cos 147 kartierten Restriktionsfragment entspricht.
Die Region Oa (cos 146) wird von dem Suchklon m147-2 bei Hybridisierungen mit niedriger Stringenz nicht erkannt. Die Homologie zwischen beiden Regionen beschränkt sich somit auf den aus den Restriktionskarten ersichtlichen Teil (Abbildung 21).
Für die beobachtete Divergenz zwischen beiden Regionen gibt es prinzipiell drei mögliche Erklärungen:

a.) Die Regionen Oa und Ob repräsentieren verschiedene Allele derselben genetischen Region (Deletions-Insertionspolymorphismus)
b.) Die Regionen Oa und Ob sind an verschiedenen Positionen innerhalb des V_K-Locus angeordnet
c.) Der beobachtete Homologieabbruch beruht auf einem Klonierungsartefakt.

Um zwischen den ersten beiden Erklärungsmöglichkeiten zu diskriminieren wurden die DNA's von 17 nicht verwandten menschlichen Individuen mit der Probe m147-2 (Ob-spezifisch) analysiert: Nach Spaltung mit der Restriktionsnuklease Bgl II wurden die menschlichen DNA's elktrophoretisch aufgetrennt und auf Membranfilter transferiert. Diese Filter wurden dann mit der Probe m147-2 hybridisiert. Die Ob-Region konnte in jeder der 17 unterschiedlichen individuellen DNA's nachgewiesen werden. Bei einer allelischen Beziehung beider Regionen würde man eine Verteilung (O-aa, O-ab, O-bb) bei den untersuchten Individuen erwarten. Ein Individuum mit der Konfiguration O-aa würde sich bei der beschriebenen Analyse durch das Fehlen der für die Region Ob charakteristischen Hybridisierungsbande (Bgl II-Fragment, 5,2 kb zu erkennen geben. Da diese Situation innerhalb der 17 Individuen nicht nachgewiesen werden konnte, ist es eher wahrscheinlich, daß die Regionen Oa und Ob an verschiedenen Positionen des V_K-Locus

angeordnet sind. Die Enstehung der beobachteten Struktur (cos 147) über eine artifizielle Ligierung von Restriktionsfragmenten, die im Genom nicht kontinuierlich angeordnet sind kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Zur Klärung der Frage, welcher der beiden Cosmidklone die Ausgangssituation (cos 143) extendiert, wurden 3 homologe DNA-Fragmente aus allen 3 Cosmidklonen (cos 143, cos146 und cos 147) sequenziert. Die Sequenzen in den untersuchten Bereichen (250 bp) erwiesen sich jedoch als identisch.

Die Restriktionskarte im 3'-Teil der O-Region ist daher so dargestellt, daß der Cosmidklon, der am weitesten und perfekt mit der Ausgangssituation überlappt (cos 146), zusammen mit dem Ausgangscosmid (cos143) eine kontinuierliche genomische Region bildet (Oa-Region).

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Organisation der V-Gensegmente für leichte Immunglobulinketten vom K-Typ beim Menschen untersucht.
Die erhaltenen Resultate werden sowohl im Zusammenhang mit allgemeinen Fragestellungen, die die Genomorganisation von Multigenfamilien betreffen, als auch im Hinblick auf spezifisch immungenetische Fragen diskutiert. Im Vordergrund des Interesses steht da die Frage nach der Anzahl der V_K-Gensegmente beim Menschen, durch deren Beantwortung man sich wichtige Aufschlüsse über den Beitrag der Keimbahn zur Diversifizierung der Immunglobuline erhofft (siehe Einleitung).

Der methodische Schwerpunkt der Arbeit bestand in der Konstruktion von menschlichen Cosmidgenbanken, sowie in der Isolierung und Charakterisierung rekombinanter Cosmidklone. Die Repräsentativität der verwendeten Genbanken und die Zuverlässigkeit der strukturellen Daten, die über rekombinante Cosmidklone erhalten wurden, sind wichtige Parameter im Hinblick auf Aussagen über Anzahl und Organisation von V-Gensegmenten. Beide Aspekte werden daher im folgenden ebenfalls diskutiert.

3.1. Kartierung des menschlichen V_K-Locus durch Analyse rekombinanter Cosmidklone

Zur Isolierung einzelner Regionen des menschlichen V_K-Locus wurden klonierte menschliche V_K-Gensegmente als Suchklone verwendet. Aufgrund der Sequenzheterogenität der menschlichen V_K-Gene erschien es sinnvoll, die Cosmidgenbanken mit DNA-Proben für die verschiedenen V_K-Subgruppen zu analysieren, um möglichst alle Mitglieder der Multigenfamilie zu erfassen. Die V_K-Gene der Subgruppen II und III konnten auf den Cosmidklonen, die mit einer V_KI-Probe isoliert wurden, anfangs nur als schwache

Hybridisierungssignale nachgewiesen werden (63). Die Detektion dieser Gensegmente wurde dann durch V_KII- und V_KIII-Proben, die im weiteren Verlauf der Arbeit zur Verfügung standen, wesentlich erleichtert (57, 60, 63).
Die Analyse der Klone, welche mit V_KI-IV-spezifischen Suchklonen isoliert worden waren, ergab mehrere Gruppen überlappender Cosmidklone. Von einigen dieser Gengruppen konnte gezeigt werden, daß sie Teilstrukturen des menschlichen V_K-Locus repräsentieren (Region A, B, E, L, O, W). Auf anderen isolierten Regionen konnten V_K-Gensegmente nachgewiesen werden, die offenbar durch einen bisher noch nicht identifizierten Mechanismus auf andere menschliche Chromosomen transponiert wurden (59). Die chromosomale Lokalisierung einer Gruppe von 5 V-Gensegmenten (T-Region) steht bisher noch aus.

Durch die Technik des "chromosomal walkings" wurden, ausgehend von den Regionen O, Wa und Wb Versuche unternommen, die auf Chromosom 2 lokalisierten Teilstrukturen zu extendieren, mit dem Endziel, eine zusammenhängende Genkarte des menschlichen V_K-Locus zu etablieren. Durch Isolierung und Restriktionskartierung von extendierenden Cosmidklonen konnte jedoch bisher keine Verknüpfung einzelner Regionen erreicht werden.

Durch überlappende Cosmid- und Phagenklone konnten bereits mehrere komplexe genetische Loci charakterisiert werden. Beispiele hierfür sind der Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus (MHC) (41, 42), oder die Loci "Ace", "rosy", sowie der Bithorax-Komplex der Taufliege Drosophila melanogaster (78). Das Vorliegen einer genetischen Karte für die genannten Loci hat die Analyse von Daten, die über gentechnologische Methoden erhalten wurden, erleichtert. Bei Drosophila-melanogaster wurde darüber hinaus eine Mutante mit einer chromosomalen Inversion verwendet, um eine lange Distanz zwischen zwei Genloci zu überspringen ("rosy"-Locus, Bithorax-Komplex).

FUr den menschlichen V_K-Locus liegen derartige Daten, an denen die Klonierungsstrategie orientiert werden kann, naturgemäß nicht vor.

Durch zwei molekularbiologische Methoden, die in jüngerer Zeit beschrieben wurden, sollte es jedoch möglich sein, Aufschluß über den Abstand und die Orientierung der isolierten Regionen innerhalb des V_K-Locus zu erhalten. Von Schwartz und Cantor (79) sowie Carle und Olson (80) ist eine Methode beschrieben worden, die die Auftrennung und Analyse von DNA-Spezies im Größenbereich von 100 kb bis mehreren 1000 kb erlaubt. Restriktionsfragmente dieser Größenordnung können über Restriktionsenzyme wie Not I und Sfi I, die eine oktamere Nukleotidsequenz erkennen, erzeugt werden. Nukleasen wie Nru I, Pvu I und Sal I, deren Erkennungssequenzen das Dinukleotid-CpG enthalten spalten außerordentlich selten innerhalb der bisher kartierten Bereiche des V_K-Locus. Auch diese Enzyme wären für die Erzeugung großer Fragmente geeignet. Durch Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Fragmente mit Suchklonen, die die einzelnen Regionen spezifisch erkennen, könnten wertvolle Informationen über die Abstände und die relative Anordnung der bisher isolierten Teilstrukturen erhalten werden.

Von Collins und Weissman (81) ist eine weitere Methode beschrieben worden, die es theoretisch erlaubt, ausgehend von einer bekannten Struktur, für die eine DNA-Probe existiert, Restriktionsfragmente zu klonieren, die in großer Distanz vom Suchklon entfernt liegen. Die Methode umfaßt die Erzeugung großer Partialspaltungsfragmente, die über einen geeigneten Selektionsmarker zirkularisiert werden. Als Selektionsmarker wird ein Suppressor tRNA-Gen (supF) vorgeschlagen. Die Nachspaltung der großen DNA-Ringe mit einer Restriktionsnuklease (z.B. Eco RI) erlaubt, nach Ligierung der entstandenen Fragmente an λ-Vektorarme, die anschließende Selektion von Klonen, in denen das Markergen von DNA-Fragmenten flankiert wird, die im Genom weit entfernt liegen. Eine Kombination der genannten Methoden, zusammen mit der Technik der Isolierung und Charakterisierung überlappender Cosmidklone erscheint zur weiteren Analyse des V_K-Locus sinnvoll.

Schwierigkeiten bei der Erstellung einer zusammenhängenden Restriktionskarte des V_K-Locus treten dadurch auf, daß häufig sehr ähnliche, aber nicht völlig identische Strukturen isoliert werden. Dieser Umstand macht zusätzliche Versuche nötig, wie sie

in der vorliegenden Arbeit für die Regionen W und O beschrieben sind. A priori kann nicht entschieden werden, ob strukturelle Unterschiede auf das Vorliegen von zwei Allelen derselben genetischen Region, oder auf ein jüngeres Duplikationsereignis während der Evolution zurückzuführen sind.

3.2. Zuverlässigkeit von strukturellen Daten, die über rekombinante Cosmidklone erhalten wurden

Bei der Konstruktion der in der vorliegenden Arbeit analysierten Genbanken wurde besonderes Augenmerk darauf verwendet, rekombinante Cosmidklone zu erhalten, die ein zuverlässiges Ausgangsmaterial zur Ermittlung struktureller Daten darstellen. Zwei Gesichtspunkte müssen im Hinblick auf die Forderung, daß die rekombinanten Nukleinsäuren ein korrektes Bild von der Genomorganisation liefern sollen, beachtet werden:

1.) Die Erzeugung artifizieller Ligierungsprodukte bei der Konstruktion rekombinanter Cosmide kann durch die Wahl eines geeigneten Kostruktionsprinzips (37) weitgehend vermieden werden
2.) Aufgrund von Rekombinationsereignissen können bestimmte DNA-Sequenzen in rec^+-E. coli Wirtsstämmen nicht stabil vermehrt werden (38).

Beide Forderungen wurden bei der Konstruktion der Genbanken IIIa,b,c und IVa,b (51) berücksichtigt. Die entsprechenden Versuche sind in Kapitel 2.1. beschrieben.
An dieser Stelle wird eine quantitative Übersicht gegeben, die zeigen soll, inwieweit die Bemühungen zum Erfolg geführt haben.

Aus den genannten Genbanken wurden insgesamt 281 Cosmidklone isoliert und mit Restriktionsnukleasen analysiert. Ligierungsartefakte, die sich durch eine Integration von mehreren Vektorkopien pro rekombinantem DNA-Molekül zu erkennen geben, konnten bei insgesamt 5 Cosmidklonen nachgewiesen werden. Bei

zwei dieser Klone (cos 162 (51), cos 209) waren die Vektoranteile so angeordnet, daß zwei genomische Restriktionsfragmente in einem rekombinanten Molekül vereinigt wurden. Die anderen drei Cosmide (cos 107, cos 113, cos 213) enthalten ein kontinuierliches genomisches Restriktionsfragment; die beiden Vektormoleküle liegen hier miteinander verknüpft vor.
Insgesamt konnten Ligierungsartefakte also nur in 1,8% der untersuchten Cosmidklone nachgewiesen werden. Die artifizielle Ligierung von genomischen Restriktionsfragmenten untereinander ist schwieriger nachzuweisen. Da jedoch nahezu alle bisher isolierten Regionen durch mehrere überlappende Cosmidklone repräsentiert werden, muß davon ausgegangen werden, daß auch diese Artefaktmöglichkeit durch die gewählte Klonierungsstrategie weitgehend vermieden wurde.
Von E. Lötscher (71) und B. Straubinger (51) wurden 2 rekombinante Cosmidklone analysiert, die sich nicht stabil in E. coli 490A propagieren lassen (cos 215, cos 515). In DNA-Präparationen dieser Klone läßt sich neben dem rekombinanten Cosmid superhelicale Vektor-DNA (pHC 79) nachweisen. Daß beide Moleküle bei der Transfektion in eine E. coli Zelle gelangt sind, läßt sich nahezu ausschließen, da superhelicale Vektor DNA sicher nicht in nachweisbaren Mengen im Tranfektionsansatz vorhanden war und außerdem nicht in vitro verpackbar ist. Dies bedeutet, daß die genomischen Restriktionsfragmente beider Klone im Wirtsstamm nach und nach deletiert werden, möglicherweise über ein rec A-unabhängiges Rekombinationsereignis. Bei einem weiteren Cosmidklon (cos 164) besteht ebenfalls der Verdacht, daß Teile des genomischen Fragments deletiert wurden. Die cos-Stellen befinden sich in diesem Cosmid in einem Abstand von nur 27 kb. Konstrukte dieser Größe können nicht verpackt werden. Genetische Instabilitäten bei rekombinanten Cosmiden, die wahrscheinlich auf intramolekularen Rekombinationsereignisen beruhen sind auch von anderen Autoren, allerdings in weit höherer Frequenz beschrieben worden (82, 83). Die insgesamt günstige Bilanz (mehr als 99% der Cosmidklone ließen sich stabil propagieren) spricht dafür, daß E. coli 490A (rec A^-) ein geeigneter Wirtsstamm für rekombinante Cosmide ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß nur 2,7% der untersuchten Cosmide unerwünschte strukturelle Merkmale aufwiesen.

Es gibt einen Fall, bei dem man nicht ausschließen kann, daß eine unterschiedliche Anordnung von genomischen und klonierten Restriktionsfragmenten vorliegt: Am 5'-Ende der Region Chr.1 weist eines von 6 Cosmiden (cos 116) eine abweichende Struktur auf, stimmt jedoch ansonsten hinsichtlich seiner Restriktionskarte völlig mit den anderen Cosmidklonen, die diese Struktur repräsentieren überein. Der beschriebene Homologieabbruch könnte auf einem Unterschied zwischen zwei Allelen der Region Chr.1 beruhen. Es ist jedoch möglich, daß es sich bei dem Klon cos 116 um ein artifizielles Ligierungsprodukt handelt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus der besonderen Struktur transponierter V_KI-Gene: Die 5'-Flanke des V_K-Gens der Region Chr.1 weist hinsichlich der Restriktionskarte sehr starke Homologien zu anderen V_KI-Genen auf, die auf andere Chromosomen transponiert wurden (51, 59). Es ist daher nicht abwegig anzunehmen, daß die von cos 116 repräsentierte Struktur nicht in einer allelischen Beziehung zur Region Chr.1 steht. Das auf cos 116 lokalisierte V_KI-Gen könnte ein Vertreter einer amplifizierten Gruppe transponierter V_KI-Gene sein, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind und über weite Strecken homologe Flanken besitzen.

3.3. Abstand und Orientierung von V-Gensegmenten

Aus den Daten, die durch die Restriktionskartierung rekombinanter Cosmidklone erhalten wurden, lassen sich detaillierte Aussagen über den Abstand einzelner V_K-Gensegmente voneinander und ihrer Orientierung zueinander treffen.

Hinsichtlich der Genabstände ergibt sich ein heterogenes Bild. Innerhalb der untersuchten Regionen (B, O, T und W) konnten intragenische Abschnitte in der Größenordnung von 1 kb bis 15 kb

nachgewiesen werden. Bezogen auf die einzelnen Regionen ergibt sich ebenfalls kein einheitliches Bild: Neben Gengruppen mit relativ regelmäßigen Abständen (B-Region, 12 kb und 15 kb; T-Region, 5-10 kb), wurden Teilstrukturen des V_K-Locus charakterisiert, in denen die Distanzen zwischen einzelnen V-Gensegmenten stärker variieren (O-Region, 1-15 kb; W-Region 5-15 kb).
Diese Aussagen gelten mit der Einschränkung, daß die Existenz von V-Gensegmenten, die mit den verwendeten subgruppenspezifischen Proben nicht erkannt wurden, innerhalb der charakterisierten Regionen nicht ausgeschlossen werden kann. Dabei könnte es sich sowohl um stark divergierte Pseudogene, als auch um Mitglieder bisher nicht identifizierter Subgruppen handeln. Die Existenz eines menschlichen V_K-Gensegments, welches nicht einer der beschriebenen Subgruppen entspricht, konnte in jüngerer Zeit nachgewiesen werden (73). Mittels eines Subklons aus dem codierenden Bereich dieses V_K-Gens (V_KV) war seine Lokalisierung innerhalb der B-Region durch W. Lorenz (72) möglich.

Im 3'-Teil der Wa Region konnten über eine Distanz von ca. 80 kb keine V-Gensegmente nachgewiesen werden. Eine ähnliche Situation wurde für das 3'-Ende der Region Ob erhalten. Die Existenz von langen, nicht-codierenden terminalen Bereichen in diesen Regionen läßt prinzipiell zwei Interpretationen zu:
1.) Die genannten Bereiche repräsentieren terminale Regionen des menschlichen V_K-Locus
2.) Ein Kennzeichen der Gesamtstruktur der menschlichen V_K-Multigenfamilie besteht in einer alternierenden Abfolge kompakt angeordneter V-Gensegmente und größerer Bereiche, die nicht für V-Gene codieren.
Eine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten kann letztlich erst nach Erstellung einer zusammenhängenden physikalischen Genkarte des V_K-Locus getroffen werden.

Ein Vergleich der strukturellen Daten, wie sie für den menschlichen V_K-Locus erhalten wurden mit anderen V_L- oder V_H-Multigenfamilien ist nur sehr bedingt möglich, da über deren Organisation sehr wenig bekannt ist. Von Rechavi et al. (21) wurde eine Region

von ca. 25 kb aus dem menschlichen V_H-Locus isoliert, innerhalb derer drei V_HIII-Gensegmente in einem Abstand von jeweils 8 kb nachgewiesen werden konnten. Die Organisation menschlicher V_H-Gensegmente wird im Labor von T. Honjo mit der Methode der Cosmidklonierung untersucht (13). Ergebnisse dieser Arbeit sind jedoch noch nicht veröffentlicht worden.

Die Frage nach der gegenseitigen Orientierung der V-Gensegmente in der Keimbahnanordnung ist im Zusammenhang mit dem Mechanismus der V-J Rekombination von Interesse. Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß Teile der DNA zwischen V und J bei manchen Myelomen nach der Umlagerung im Genom erhalten bleiben (84), ließ sich ein ursprünglich von Tonegawa et al. (85) vorgeschlagenes Modell (Exzision und Deletion der DNA zwischen V und J) nicht mehr halten. Als mögliche Mechanismen für die V-J Umlagerung werden heute Schwesterchromatidaustausch (86, 87), sowie ein Inversions-Deletions-Mechanismus (75, 88) vorgeschlagen. Der letztgenannte Mechanismus erklärt die Befunde, die aufgrund der Analyse vieler Myelom-Zellinien erhalten wurden am besten. Lewis et al. (89) konnten darüber hinaus nach Einbringen retroviraler Konstrukte in eine transformierte Prä-B-Zellinie zeigen, daß ein V_K-Segment durch Inversion an J_K umgelagert wird.
Im Deletions-Inversions-Modell wird eine unterschiedliche gegenseitige Orientierung der V-Gensegmente in der Keimbahnkonfiguration vorgeschlagen. In der vorliegenden Arbeit wurde die 5'-3'-Orientierung einiger V_K-Gene in den Regionen Wa und Wb durch Hybridisierungsversuche ermittelt. Die Versuche ergaben, daß die V-Gensegmente innerhalb der genannten Regionen in gleicher Polarität angeordnet sind. Analoge Resultate wurden von M. Pech für die L-Region (44) und von B. Straubinger für die A-Region (58), sowie von H.G. Bauer für die Region Chr.22 (58) erhalten. Eine unterschiedliche Orientierung benachbarter V_K-Gene wurde bisher innerhalb des menschlichen V_K-Locus in keinem Fall nachgewiesen. Da die relative Anordnung der bisher charakterisierten Regionen zueinander unklar ist und die Orientierung noch nicht für alle isolierten V_K-Gene ermittelt wurde, muß die endgültige Beantwortung der Frage weiterhin offen bleiben.

Eine inverse Orientierung von Keimbahn V-Gensegmenten konnte innerhalb des V_λ -Locus des Huhns nachgewiesen werden (22). Die V_λ-Genfamilie des Huhns umfaßt 8-12 V-Gensegmente, von denen 4 zusammen mit dem J- und C-Segment in Form eines rekombinanten Phagenklons isoliert werden konnten. Bei dem invers orientierten V_λ-Gen handelt es sich um ein Pseudogen.

3.4. Duplikationen innerhalb des V_K-Locus

Mit subgruppenspezifischen Suchklonen wurden Strukturen isoliert, die über weite Strecken sehr homologe Restriktionskarten aufweisen. Für die Regionen Wa und Wb konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß ihre Homologie nicht auf das Vorliegen zweier Allele zurückzuführen ist, sondern daß beide Strukturen an verschiedenen Positionen des V_K-Locus angeordnet sind. Analoge Aussagen wurden von M. Pech für die Regionen La und Lb (57) und von B. Straubinger für die Regionen Aa und Ab (51), sowie durch Bentley und Rabbitts (76) für zwei homologe menschliche V_K-Gene erhalten.
Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß große Bereiche innerhalb des V_K-Locus dupliziert vorliegen. Als Mechanismus für die Expansion von Multigenfamilien wird ungleiches cross-over vorgeschlagen (90). Die hohe Homologie zwischen den Regionen Wa und Wb, sowie den anderen duplizierten Teilstrukturen des V_K-Locus läßt ein in der Evolution nicht weit zurückliegendes Ereignis vermuten. Die Konservierung der homologen Teilstrukturen kann jedoch auch durch sekundär wirkende genetische Mechanismen, etwa genkonversionsähnliche Ereignisse (57), erklärt werden. Dazu muß jedoch angenommen werden, daß die Aufrechterhaltung der Homologie zwischen duplizierten Anteilen des V_K-Locus einen Selektionsvorteil für den Organismus bedeutet.

Von Pech et al. (57) wurde diskutiert, daß eine inverse Orientierung der duplizierten Anteile des V_K-Locus möglicherweise Vorteile bei der V-J Umlagerung bieten würde. Ausgehend vom Inver-

sions-Deletions-Modell könnten duplizierte Gene, die für identische Aminosäuresequenzen codieren, sowohl durch Inversion, als auch durch Deletion, oder durch eine Kombination beider Prozesse umgelagert werden. Dadurch würde die Flexibilität des Systems erhöht.

Nach dem heutigen Stand der Analyse muß angenommen werden, daß neben duplizierten Anteilen auch Regionen innerhalb des V_K-Locus existieren, die im haploiden Genom nur einmal vorkommen. Für die V_KIV- und V_KV-Gensegmente (B-Region, siehe Abbildung 9) konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß sie nur durch jeweils eine Kopie innerhalb des V_K-Locus vertreten sind (62, 63, 73).

Hinweise auf eine mögliche Duplikation der O-Region, die ebenfalls im Rahmen der vorligenden Arbeit näher untersucht wurde, ergaben sich erst nach der Analyse von Cosmidklonen, die mit einem Extensionssuchklon für den 3'-Teil dieser Struktur isoliert worden waren. Die Restriktionskarten der extendierenden Cosmidklone cos 146 und cos 147 stimmen im überlappenden Teil vollständig mit dem Klon cos 143 überein aus dem der Suchklon konstruiert wurde. Im extendierenden Teil werden die Restriktionskarten beider Cosmidklone divergent. Diese komplexe Situation kann durch das alternierende Auftreten duplizierter und nicht duplizierter Strukturen erklärt werden. Versuche, die diese Interpretation nahelegen sind im Ergebnisteil (Kapitel 2.6.) beschrieben.
Aufgrund der erhaltenen Daten kann man die Existenz zweier Regionen (Oa und Ob) innerhalb des V_K-Locus annehmen, deren Kernbereich dupliziert ist und deren Flanken nur einmal im haploiden Genom vorkommen. Diese Annahmen gelten jedoch nur unter der Vorraussetzung, daß die Cosmidklone in diesem Bereich die genomische Struktur korrekt wiedergeben. Über das Ausmaß einer möglichen Duplikation innerhalb der O-Region können aufgrund der bisher ermittelten Daten keine Aussagen getroffen werden, da nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von Cosmidklonen für diese Struktur isoliert wurde (vgl. Kapitel 3.6.).

Die Hinweise, daß auch die Region W aus einem duplizierten Teil und nicht-duplizierten Anteilen besteht sind ebenfalls indirekter Natur. Es fällt auf, daß mit den beiden Extensionssuchklonen m166-1 (Region Wa) und m167-1 (Region Wb) jeweils nur Cosmidklone aus der Region isoliert wurden, aus denen die Suchklone stammen (Kapitel 2.4.2. und 2.4.3., Abbildung 13). Aufgrund der großen Zahl der isolierten Cosmide kann angenommen werden, daß beide Suchklone keine homologe Struktur in der jeweils anderen Subregion erkennen.

Bentley und Rabbitts (28) haben DNA's verschiedener menschlicher Individuen mit Restriktionsnukleasen gespalten und die Bandenmuster die sie nach Hybridisierung mit zwei V_KI-Proben erhalten haben verglichen. Dabei konnten sie feststellen, daß bemerkenswert wenig Unterschiede im Bandenmuster innerhalb der untersuchten Individuen vorliegen, was bedeutet, daß die Restriktionskarten der V_K-Gene und ihrer Flanken zwischen verschiedenen Haplotypen gut vergleichbar sind. Analoge Resultate wurden auch von R. Mocikat (91) aus unserem Labor mit V_K-Proben und anderen Suchklonen aus dem menschlichen V_K-Locus erhalten. Dieses Bild bestätigt sich auch auf der Ebene der Restriktionskarten rekombinanter Cosmidklone. Deutliche Unterschiede zwischen homologen Regionen konnten in jedem Fall auf das Vorliegen duplizierter Strukturen zurückgeführt werden. Innerhalb der Einzelregionen wurden in wenigen Fällen nur minore Unterschiede zwischen den Restriktionskaren überlappender Cosmidklone nachgewiesen.

3.5. Anordnung von V-Gensegmenten unterschiedlicher Subgruppen innerhalb des menschlichen V_K-Locus

Wenn als gültig vorausgesetzt wird, daß V_H- und V_L-Multigenfamilien durch aufeinanderfolgende Duplikationen von Vorläufergenen über einen Mechanismus wie ungleiches cross-over während der Evolution entstanden sind, sollte man erwarten, daß eng verwandte V-Gensegmente, wie die Mitglieder einer Subgruppe, "in

Blöcken" angeordnet sind. Eine gemischte Struktur, d.h. eine physikalische Verknüpfung von V-Gensegmenten verschiedener Subgruppen würde auf ein komplexes Amplifikationsschema hindeuten.
In Untersuchungen anderer Labors, die die Anordnung von V-Gensegmenten verschiedener Subgruppen zum Gegenstand hatten, wurden vor allem indirekte Methoden angewendet. Die meisten der bisherigen Aussagen beruhen auf Blothybridisierungen von Myelom-DNA's mit V-Proben bestimmter Familien, Gruppen oder Subgruppen.
Aufgrund von Deletionen, die bei der V-D-J-Umlagerung auftreten wurde für die Gene der menschlichen V_HIII-Subgruppe eine Anordnung 3' von den Mitgliedern der V_HII-Subgruppe postuliert (21).
Die menschlichen V_HIII-Gene werden nach Rechavi et al. (21) als distinkte physikalisch zusammengehörige Multigenfamilie angesehen, die separat von den Mitgliedern anderer V_H-Subgruppen innerhalb des Locus angeordnet ist.
Ähnliche Aussagen wurden mit der Methode der Deletionskartierung für die 7 V_H-Familien im Maus-Genom erhalten (92, 93). Eine physikalische Verknüpfung konnte ebenfalls für eine Gruppe sehr eng verwandter Maus V_K-Keimbahngene (V_K-21 Gruppe) nachgewiesen werden (94).

Eine Aussage über die Anordnung von menschlichen V_K-Genen verschiedener Subgruppen war erstmals nach der Analyse von Cosmidklonen der L-Region möglich, die im Rahmen dieser Arbeit mit einer V_K-Probe isoliert wurden. Innerhalb einer chromosomalen Region von 80 kb konnten neben 5 sehr ähnlichen V_KI-Genen, 2 Gensegmente der Subgruppe III und ein Gensegment der Subgruppe II lokalisiert werden (63).
Nach der Analyse weiterer V_K-Gengruppen im Rahmen der vorliegenden Arbeit (Region B, O, T und W) sowie der Region A (51), kann eine gemischte Anordnung der Mitglieder einzelner V_K-Subgruppen als allgemeines Organisationsmerkmal angesehen werden.

Diese heterogene Struktur kann nicht durch ein einfaches Amplifikationsschema für die Multigenfamilie während der Evolution erklärt werden. Neben der Expansion von Vorläufergenen für die einzelnen Subgruppen über ungleiches cross-over, muß man Trans-

positionsereignisse von V-Gensegmenten während der Evolution annehmen, die zum heutigen Bild einer gemischten Gengruppe geführt haben. Als jüngstes Ereignis kann die Duplikation großer Teile des V_K-Locus postuliert werden (63). Bezieht man Transpositionsereignisse während der Evolution zur Erklärung der heutigen Struktur ein, so erscheint es erstaunlich, daß die Gensegmente verschiedener Subgruppen, soweit bisher ermittelt, in gleicher Orientierung angeordnet sind. Die Konservierung invers orientierter V-Gensegmente scheint keinen Selektionsvorteil für den Organismus zu bieten. Man kann annehmen, daß die durch Transposition invers integrierten V-Gensegmente schnell divergiert sind und daher heute nicht mehr durch Hybridisierung mit V_K-Proben nachgewiesen werden können.

3.6. Liefern die bisher isolierten Cosmidklone ein repräsentatives Bild des menschlichen V_K-Locus?

Durch die Analyse repräsentativer Cosmidgenbanken mit menschlichen V_K-Proben, Versuchen also, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden, sollte es möglich sein, alle menschlichen V_K-Gensegmente zu isolieren und somit Aussagen über die Multiplizität der Keimbahn-V_K-Gene zu treffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden etwa 100 rekombinante Cosmide mit 4 verschiedenen Suchklonen für menschliche V_K-Gene isoliert (vgl. Kapitel 2.2.2.). Weitere Cosmidisolierungen wurden von H.G. Bauer, ebenfalls unter Verwendung der in Kapitel 2.2. beschriebenen Genbanken, mit drei verschiedenen V_KIII-Proben durchgeführt (58). Ferner wurden Cosmide mit Extensionssuchklonen isoliert. Durch Restriktionsanalyse dieser Cosmide, die sowohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit, als auch von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde (51, 57, 58, 64), konnten Regionen definiert werden, die insgesamt ca. 1200 kb umfassen.

Insgesamt konnten bisher ca. 75 verschiedene, nicht-allelische V_K-Gensegmente innerhalb der charakterisierten Strukturen nachgewiesen werden. Von ca. 10% dieser Gensegmente konnte gezeigt werden, daß sie nicht auf Chromosom 2 lokalisiert sind und somit keinen Beitrag bei der Generierung funktioneller Antikörper leisten können (59). Ein hoher Anteil an Pseudogenen muß auch für die auf Chromosom 2 lokalisierten V_K-Gene postuliert werden. Dies geht aus Sequenzanalysen verschiedener Mitglieder der Arbeitsgruppe (20, 44, 51, 61, 64) und aus Daten anderer Labors (76, 95) hervor.

Versuche, die Anzahl der menschlichen V_K-Gensegmente zu ermitteln, sind bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden. Die bisherigen Daten beruhen jedoch ausnahmslos auf indirekten Methoden, wie Blot-Hybridisierungen und DNA-RNA Lösungshybridisierungen. Von Bentley und Rabbitts (28) wurde aufgrund der Zahl von Restriktionsfragmenten bei genomischen Blot-Hybridisierungen mit einer V_KI-Probe die Anzahl der menschlichen V_K-Gene auf 15-20 geschätzt. Durch spätere Versuche (60, 96) wurde gezeigt, daß diese Schätzungen zu niedrig angesetzt waren. Die durch die Analyse von rekombinanten Cosmidklonen bisher erhaltene Zahl ist um den Faktor 4-5 höher, als es die ursprünglichen Daten von Bentley und Rabbitts erwarten ließen. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, daß größere Duplikationen, die für den menschlichen V_K-Locus nachgewiesen wurden, in einer indirekten Analyse verborgen bleiben, zum anderen wurde das Ausmaß der Kreuzhybridisierung von Mitgliedern der Subgruppe II und III mit einer V_K-Probe von den oben genannten Autoren stark überschätzt.
Bei der Erörterung der Frage, inwieweit die bisher isolierten Cosmidklone ein repräsentatives Bild des V_K-Locus liefern, müssen verschiedenen Faktoren beachtet werden:

1.) Repräsentativität der verwendeten Genbanken
2.) Hybridisierungsverhalten der verwendeten V_K-Proben bei Koloniefilterhybridisierungen
3.) Experimentelle Faktoren, z.B. die Qualität der Cosmidisolierungsversuche

Da es schwierig ist, den Einfluß der einzelnen Faktoren auf die erhaltenen Ergebnisse auseinanderzuhalten, erscheint es wenig sinnvoll, die drei Punkte getrennt zu diskutieren. Um Aussagen darüber zu erhalten, wie gut einzelne Regionen des V_K-Locus in den untersuchten Genbanken repräsentiert sind, müssen die Ergebnisse von Cosmidisolierungsversuchen mit spezifischen Suchklonen für die einzelnen Strukturen (Extensionssuchklone) verglichen werden. Bei Koloniefilterhybridisierungen mit V_K-Proben werden die erhaltenen Resultate stark von den Hybridisierungseigenschaften der verwendeten Suchklone mit den klonierten V-Gensegmenten innerhalb der einzelnen Regionen beeinflußt (Sequenzhomologie der V_K-Proben mit klonierten V-Gensegmenten unterschiedlicher Regionen). Dies soll am Beispiel der O-Region erläutert werden:

Mit dem V_KI-Suchklon m1-3 wurden nur 2 Cosmidklone der O-Region isoliert, wohingegen 11 Cosmide für die L-Region und 6 Cosmide der W-Region erhalten wurden. Mit V_KII- und V_KIII-Proben konnte kein einziger Cosmidklon der O-Region erhalten werden, obwohl diese Region Gensegmente der Subgruppen II und III enthält (mit V_KII- und V_KIII-Proben wurden für die L-Region 43 Cosmide, für die W-Region 10 Cosmide isoliert). Die hohe Anzahl von Cosmidklonen der L-Region kann dadurch erklärt werden, daß zwei der verwendeten Proben (m106-1,V_KII; m21-4,V_KIII) als Subklone aus der L-Region erhalten wurden. Der V_KI-Suchklon ist zu den V_KI-Genen der L-Region zu über 90% sequenzhomolog (20).
Der Vergleich dieser Daten mit Cosmidisolierungen unter Verwendung spezifischer Suchklone für die einzelnen Regionen ergibt ein anderes Bild (vergleiche auch Kapitel 2.2.2. Tabelle 5). Cosmidklone der Regionen O und W wurden mit Extensionssuchklonen mit vergleichbarer Effizienz erhalten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die Regionen O und W gleich gut in den untersuchten Genbanken repräsentiert waren.
Diese Überlegungen setzen voraus, daß die einzelnen Cosmidisolierungsversuche mit gleicher Qualität durchgeführt wurden. Diese Voraussetzung ist jedoch nicht immer gegeben. Faktoren, die die Qualität der Koloniefilterhybridisierungen beeinflussen werden im Ergebnisteil (Kapitel 2.2.1.) erörtert. Der Cosmidklon

cos 111 (B-Region) wurde als einziges Cosmid mit einer V_KIV-Probe aus der Genbank IIIb isoliert. Die Hybridisierung mit dem verwendeten Suchklon (Sequenzhomologie 100% (62)) ergab nur undeutliche Signale über einem hohen Hintergrund an unspezifisch gebundener Radioaktivität. Dieser Isolierungsversuch läßt daher keine Aussagen über die Repräsentanz der B-Region in der Genbank zu.

Die Genbanken IIIa,b,c wurden ausgehend von Sau 3A-Partialspaltungsfragmenten konstruiert. Lokale Anhäufungen von Sau 3A-Spaltstellen in dem untersuchten genomischen Bereich könnten zu einer unausgewogenen Repräsentanz einzelner Regionen führen. Eine mittelrepetitive Sequenzfamilie kann durch Sau 3A-Spaltung G+C-reicher menschlicher DNA-Fraktionen nachgewiesen werden (Repetitionsgrad $4x10^4$/haploides Genom), scheint jedoch nur auf einen diskreten Teil des Genoms (ca. 0,5%) beschränkt vorzukommen (97). In den Genbanken IVa,b, die ausgehend von Msp I- bzw. Taq-Partialverdaufragmenten konstruiert wurden (51), konnten mit V_KII- und V_K-Proben keine Cosmidklone isoliert werden, die zusätzliche Regionen des V_K-Locus definieren.

Nach den oben aufgeführten Überlegungen scheint für die Beantwortung der Frage, wie weitgehend der menschliche V_K-Locus durch die bisher isolierten Cosmide repräsentiert ist, die unterschiedliche Repräsentanz verschiedener Regionen in den verwendeten Genbanken nicht von entscheidender Bedeutung zu sein. Der kritische Punkt ist vielmehr, inwieweit die verwendeten V_K-Proben auf der Ebene der Koloniefilterhybridisierung jeweils nur einen Ausschnitt des menschlichen V_K-Locus erkennen. Insgesamt wurden 7 V_K-Proben für Cosmidisolierungen verwendet, deren Sequenzhomologie untereinander im Mittel ca. 70% betrug. Die Tatsache, daß mit V_KII- und V_KIII-Proben keine Regionen gefunden wurden, die nicht schon durch die V_KI-Isolate definiert worden waren, spricht dafür, daß zumindest ein großer Teil der menschlichen V_K-Gensegmente durch die Cosmidisolierungen erfasst worden ist. Die Existenz von Gensegmenten innerhalb des V_K-Locus, die von

keiner der verwendeten V_K-Proben erkannt wurden, kann auf dem derzeitigen Stadium der Analyse jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien, Enzyme und Nährmedien

Bactoagar und Baktotrypton, sowie Hefeextrakt wurden Difco, Michigan bezogen. Ampicillin ("Amblosin") stammte von der Fa. Merck, Darmstadt. Sea Kem Agarose und Seaplaque Agarose sind Produkte der Fa. Marine Colloids, Rockland, USA. Ficoll wurde von Pharmacia bezogen, Polyvinylpyrrolidon, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galaktopyranosid (X-Gal), sowie Rinderserumalbumin (BSA) lieferte Sigma GmbH, München. Isopropylthiogalaktosid wurde bei Boehringer-Mannheim gekauft. Desoxyribonukleotide sowie Adenosin-5'-triphosphat sind ebenfalls Produkte der Fa. Boehringer-Mannheim. Alle aufgeführten Radiochemikalien stammten von New England Nuclear (NEN). Acrylamid und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurde von SERVA, Feinbiochemica, Heidelberg bezogen; Bis-Acrylamid war ein Produkt der Fa. Biomol, Ilversheim.

Enzyme:
Alle aufgeführten Restriktionsendonukleasen wurden von Boehringer-Mannheim bezogen. Alkalische Phosphatase (Kälberdarm, Spezialqualität), T4 DNA-Ligase, Desoxyribonuklease I (aus Rinderpankreas), T4 Polynukleotidkinase sowie DNA-Polymerase I (aus E. coli, Holoenzym) stammten ebenfalls von Boehringer-Mannheim. Proteinase K wurde von der Fa. Merck, Darmstadt, Lysozym von SERVA, Feinbiochemica, Heidelberg, bezogen.

Nukleinsäuren:
Lachsspermien-DNA, sowie E. coli-DNA lieferte Sigma GmbH, München. DNA des Phagenλ (cI857 Sam7) wurde bei Boehringer-Mannheim gekauft. Bakteriophagen T5-DNA wurde von G. Combriato zur Verfügung gestellt.

Alle nicht gesondert aufgeführten organischen und anorganischen Reagenzien waren Produkte der Fa. Merck, Darmstadt.

4.1.2. Bakterienstämme, Cosmidvektoren, Plasmidvektoren, Human-DNA's

Rekombinante Cosmide sowie Plasmide wurden in E. coli 490A (r_K^-, m_K^-, met^-, thr^-, leu^-, $recA^-$) propagiert. Dieser Stamm wurde von G. Hobom konstruiert und zur Verfügung gestellt. Mit in vitro verpackter λ-DNA (cI857 Sam7) wurde der von P. Leder (98) entwickelte Stamm E. coli LE 392 (supE, supF, m_K, r_K, met^-, trpR, gal^-) infiziert. Rekombinante Klone des Einzelstrang-Phagen M13 wurden im Bakterienstamm E. coli JM 103 (Δlac, pro, thi, strA, supE, endA, sbc B15, hsd R4, F''tra D36, proAB, lac J^q, ZΔM15) propagiert. Für die Herstellung von Extrakten zur in vitro Verpackung von Cosmid-DNA wurden die beiden Stämme E. coli BHB 2688 (N205, $recA^-$ [γ imm^{434}, cIts, b2, red^-, Eam, Sam/γ]) und E.coli BHB 2690 (N205, $recA^-$ [γ imm^{434}, cIts, b2, red^-, Dam, Sam,/γ]) verwendet (99).
Die DNA der Cosmidvektoren pHC 79 (100) und pJB 8 (37) wurde gemäß 4.2.2. selbst präpariert. Die entsprechenden transformierten Bakterienstämme wurden von W. Lindenmaier bzw. von D. Ish-Horowicz zur Verfügung gestellt. Die DNA des Plasmidvektors pBR 322 (101) wurde ebenfalls nach 4.2.2. selbst präpariert.
Die M13-Vektoren mp7, mp8, mp9 und mp10 (52) wurden von PL/Pharmacia-Biochemicals, Milwaukee, bezogen. M13 mp18-DNA (103) wurde von J. Messing zur Verfügung gestellt.
Menschliche DNA's verschiedener nicht verwandter Individuen wurden von M. Pech aus peripherem Blut präpariert und zur Verfügung gestellt. Die DNA's einer lymhoblastoiden Zellinie (GM607) und einer Myelomzellinie (GM1500) sowie Plazenta-DNA (AF) wurden von H.G. Klobeck zur Verfügung gestellt. Menschliche Plazenta-DNA (St) wurde von W. Lindenmaier nach der Methode von Blin und Stafford (102) präpariert und zur Verfügung gestellt.

4.1.2. Menschliche V_K-Proben

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten menschlichen V_K-Suchklone wurden von verschiedenen Mitgliedern der Arbeitsgruppe konstruiert und zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht ist in Tabelle 8 gegeben.

Klonbezeichnung	Subgruppe	klonierter Bereich	Zitat	Bemerkung
m1-3	I	L-FR 3	(20)	-
m1L-3	I	L-Intron	*	Derivat von m1-3
m1V-1	I	Intron-FR 3	*	Derivat von m1-3
m607V-3	II	L'-FR III	(60)	-
m6410-L	II	L	(65)	-
m106-1	II	CDRI-3'Flanke	(57)	-
m21-4	III	L-FR I	(63)	-
m41V-7	III	FR I-FR III	(65)	-
mJIuL-16	IV	5'-Flanke	(62)	-

Tabelle 8 Klonierte menschliche V_K-Gensegmente

Abkürzungen: L=Signalpeptid, FR="Framework"Region,CDR=hypervariable Region, *=H.G. Klobeck, unveröffentlicht.

4.2. Methoden

4.2.1. Konstruktion der Cosmidgenbanken IIIa,b,c

4.2.1.1. Erzeugung von phosphatasebehandelten Partialspaltungsfragmenten aus Plazenta-DNA mit der Restriktionsnuklease Sau 3A

Um die Eignung der Plazenta-DNA (St) Präparation als Ausgangsmaterial zur Erzeugung großer Partialverdaufragmente zu überprüfen, wurde zunächst ihre ungefähre mittlere Größe bestimmt. Hierzu wurde ca 1µg der DNA in einem 0,3%-Agarosegel (siehe 4.2.3.) aufgetrennt. Als Größenreferenzen dienten die DNA's der Bakteriophagen T5 (106 kb) und λ (Monomer: 48,5 kb, Dimer: 97 kb).
Analytische Partialspaltungen der Donor-DNA wurden mit 0,1U der Restriktionsnuklease Sau 3A pro µg DNA durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Ansatz entnommen und durch Phenolextraktion inaktiviert. Die entstandenen Abbauprodukte wurden durch Gelelektrophorese in 0,3%-Agarosegelen (vgl. 4.2.3.) analysiert; dabei wurde λ-DNA und mit Hind III gespaltene λ-DNA als Längenstandard verwendet. Aufgrund dieser Analyse wurden die Bedingungen für die präparativen Partialspaltungen festgelegt. Insgesamt wurden 28 Partialspaltungen mit je 30µg Plazenta-DNA durchgeführt, wobei unterschiedlich lange Inkubationszeiten mit der Restriktionsnuklease Sau 3A gewählt wurden. Die Ligierbarkeit der erzeugten kohäsiven Enden wurde durch Behandlung eines Aliquots der vereinigten Partialspaltungen mit T4 DNA-Ligase überprüft. Bei einer DNA-Konzentration von über 200ng/µl im Ligierungsansatz tritt bei intakten Sau 3A-Enden die Bildung langer Konkatemerer ein. Dies wurde gelelektrophoretisch nachgewiesen.
Die partiell mit Sau 3A gespaltene Plazenta-DNA wurde anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dazu wurde der Ansatz in 100mM Tris, pH 9 und 1mM EDTA mit alkalischer Phosphatase (0,05U/µg DNA) 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde

anschließend mit Phenol inaktiviert. Der Erfolg der Phosphatasebehandlung wurde durch einen Ligationstest (s.o.) überprüft. Das ligasebehandelte Fragmentgemisch darf keinen Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität gegenüber dem unbehandelten Gemisch aufweisen. Dies wurde nachgewiesen.

Die phosphatasebehandelte DNA wurde anschließend durch Dichtegradientenzentrifugation größenfraktioniert. Hierfür wurde ein linearer NaCl-Gradient (1,25M NaCl-5M NaCl in 10mM Tris, pH8,0/-1mM EDTA) verwendet (104). Die Auftrennung erfolgte für 3h bei 38 000 U/min in einem Beckman SW 41 Rotor (Beckman L8 Ultrazentrifuge). Das Molekulargewicht der DNA in den einzelnen Fraktionen wurde gelelektrophoretisch ermittelt (0,3%-Agarosegele, Längenstandards λ-DNA, λ-HindIII und T5-Eco RI; vgl. 4.2.3.). Alle Fraktionen, die Größenklassen zwischen 30 kb und 50 kb enthielten wurden vereinigt und mit Ethanol gefällt. Fraktionen mit Fragmentgrößen unter 30 kb wurden verworfen. Die so erzeugte Donor-DNA wurde für die Konstruktion der Cosmidgenbanken IIIa,b,c verwendet.

4.2.1.2. Herstellung von Vektorarmen (37)

Zur Konstruktion von Vektorarmen wurden je 20µg pHC 79-DNA in getrennten Ansätzen mit 6U Bst EII (60°C, 3h) bzw. 6U Cla I (37°C, 3h) inkubiert. Anschließend wurde die Vollständigkeit der Spaltung durch Elektrophorese in einem 1%-analytischen Agarosegel überprüft. Die 5'-Phosphatenden der erzeugten Fragmente wurden dann durch Behandlung der beiden Ansätze mit alkalischer Phosphatase entfernt (vgl. 4.2.1.1.). Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte wie in 4.2.1.1. beschrieben.
Der Erfolg der Phosphatasebehandlung wurde durch einen Ligierungstest überprüft. Dazu wurde ein Aliquot aus beiden Ansätzen mit T4 DNA-Ligase behandelt. Bei der anschließenden gelektrophoretischen Analyse darf keine Bildung von Dimeren oder Multimeren zu beobachten sein. Anschließend wurden beide Ansätze mit

6U Bam HI (3h, 37°C) inkubiert. Die Ligierbarkeit der erzeugten Enden wurde anschließend durch einen Ligierungstest (s.o.) mit gelelektrophoretischer Analyse überprüft. Die Ansätze wurden dann phenolisiert, ethanolgefällt und in einem geeigneten Volumen 10mM Tris, pH 8,0/1mM EDTA aufgenommen. In dieser Form wurde die Vektorpräparation zur Etablierung der Genbank IIIa verwendet.
Für die Genbanken IIIb und IIIc wurden die Vektoranteile, die die cos-Region enthalten durch präparative Gelelektrophorese (vgl. 4.2.3.) isoliert und in dieser Form verwendet. Ein Teil der Donor-DNA in den Genbanken IIIb und IIIc wurde mit Vektorarmen des Cosmidvektors pJB8 versehen, die wie in (37) beschrieben, hergestellt wurden.

4.2.1.3. Präparation von Extrakten für die in vitro Verpackung von Cosmid-DNA

Die Herstellung von Extrakten für die in vitro Verpackung von Cosmid-DNA erfolgte nach (105) mit kleinen Modifikationen. Eine Modifikation betraf die Zusammensetzung des Puffers B (s.u.) für die Herstellung des Gefriertau-Extrakts. Hierbei wurde Putrescin (1,4-Diaminobutan) weggelassen und dafür eine höhere Spermidin (N-(3-Aminopropyl)-1,4,-Butandiamin)-Konzentration gewählt. Diese Abänderung gegenüber der Originalvorschrift soll die Verpackung von rekombinanten Konstrukten mit größeren DNA-Insertionen begünstigen (106).
Zur Herstellung des Gefriertau-Extrakts (FTL) wurde aus einem Kolonierasen von E. coli BHB 2688 (vgl. 4.1.2.) eine Einzelkolonie entnommen und auf Wachstum bei permissiver Temparatur (28°C-32°C) und bei nicht-permissiver Temperatur (42°) getestet. Bei der nicht-permissiven Temperatur darf kein Bakterienwachstum zu beobachten sein. Eine getestete Einzelkolonie wurde als Inokulum für eine stationäre Vorkultur verwendet. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium (10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt und

10 g/l NaCl) angeimpft (OD=0,05-0,09) und bis zur frühen logarithmischen Phase (OD=0,3) inkubiert (permissive Temperatur). Die Induktion der Prophagen erfolgte für 15 min bei 45°C. Die induzierte Kultur wurde dann bei 37°C 2-3h unter guter Belüftung geschüttelt. Die Bakterien sollten nun nach Zugabe eines Tropfens Chloroform zu einem Aliquot der Kultur lysieren. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000xg) geerntet, in 3ml einer isotonischen Lösung (50mM Tris, pH 8,0; 10% Saccharose) resuspendiert und auf 6 vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt. Jedes dieser Gefäße wurde nun mit 25µl eiskalter Lysozymlösung (2mg/ml in 0,25M Tris, pH 8,0) versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden beide Ansätze sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Eis aufgetaut. Jedes Gefäß wurde dann mit je 25µl Puffer B (6mM Tris, pH 8,0; 60mM Spermidin; 20mM $MgCl_2$; 30 mM ATP; 30 mM ß-Mercaptoethanol) versetzt und vorsichtig durchmischt. Die vereinigten Ansätze wurden dann für 1h bei 4°C in einem Beckman SW 56 Rotor bei
28 000 U/min zentrifugiert (Beckman L8-Ultrazentrifuge). Die erhaltenen Überstände wurden in Portionen a'25µl auf vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Testung, Kultivierung und Induktion des Stamms BHB 2690 erfolgte wie für E. coli BHB 2688 beschrieben (s.o.). Zur Herstellung des Ultraschallextrakts (SE) wurde der durch Zentrifugation erhaltene Bakterienniederschlag in 3,6ml kaltem Puffer A (20mM Tris, pH 8,0, 1mM EDTA, 5mM ß-Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Suspension wurde solange mit Ultraschall behandelt, bis ihre Viskosität merklich abnahm (4-8 Schallstöße von ca. 5s, Branson-Sonifier, Mikrospitze, maximale Intensität). Die so erhaltene Lösung wurde für 10min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Der erhaltene Überstand wurde mit demselben Volumen kaltem Puffer A, sowie 1/6 Volumen Puffer B versetzt und in Aliquots von 15µl in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Qualität der Extrakte (FTL/SE) wurde mit Bakteriophagen λ-DNA von Wildtypgröße (vgl. 4.1.2.) getestet. Die für die in vitro Verpackung von rekombinanter Cosmid-DNA verwendeten Extrakte ergaben im Testsystem $5x10^8$-$5x10^9$ pfu/µg λ-DNA.

4.2.1.4. Ligierung und in vitro Verpackung von Vektor- und Donor-DNA

Die Ligierung der Vektorarme an die größenfraktionierten Partialverdaufragmente aus Plazenta-DNA erfolgte bei einer DNA-Konzentration von 200µg/µl-500ng/ul. Bei diesen DNA-Konzentrationen tritt bevorzugt die Bildung linearer Oligomere gegenüber der Zirkularisierung als Konkurrenzreaktion ein (107). Alle Ligierungen wurden bei einem molaren Überschuß an Vektorfragmenten gegenüber der Donor-DNA durchgeführt (vgl. 2.1.4., Tabelle 1). In einem typischen Ligierungsansatz wurden je 700ng der isolierten Vektorarme (pHC 79 oder pJB8) und 2µg partialverdaute Donorfragmente in einem Volumen von 10µl mit 1U T4 DNA-Ligase für 12h bei 14°C inkubiert.
Für die in vitro Verpackung wurden jeweils 5µl aus den Ligierungsansätzen nach (105) mit den, gemäß 4.2.1.3. präparierten Extrakten, 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1ml Phagenpuffer (100mM NaCl, 8mM $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 50mM Tris pH 7,5; 0,001% Gelatine) und einem Tropfen Chloroform beendet. In dieser Form wird die verpackte Cosmid-DNA bei 4°C aufbewahrt und liefert etwa ein Jahr gute Titer nach der Infektion von E. coli Rezipienten.

4.2.1.5. Transfektionen

Zur Propagation der rekombinanten Cosmide wurde der E. coli-Stamm 490A verwendet, dessen recA$^-$-Status vor der Etablierung der Genbanken IIIa, b, c jeweils über die relative UV-Sensitivität gegenüber dem rec$^+$-Stamm E. coli LE 392 getestet wurde (47). Zur Induktion von Phagenrezeptoren wurden die E. coli Zellen nach Leder et al. (50) mit $MgSO_4$ bei 37°C ausgehungert. Zur Adsorption der in vitro verpackten Cosmid-DNA's an die Rezipientenzelle wurden die gemäß 4.2.1.4. hergestellten Phagensuspensionen mit 2 Volumina der $MgSO_4$ behandelten E. coli 490A Zellen versetzt und 1h bei 30°C inkubiert. Zur Expression der Ampicillin-Resistenz wurde nach Zusatz von 4 Volumina LB-Medium (siehe 4.2.1.4.) weitere 30 min bei 37°C inkubiert.
Mit der erhaltenen Zellsuspension wurden Ampicillin-Agarplatten (100µg/ml Ampicillin) beimpft. Dabei wurden die Titer so gewählt, daß 5 000-10 000 Cosmidklone pro Agarplatte (Durchmesser 15 cm) nach Bebrüten bei 37°C erschienen.

4.2.1.6. Analyse von Cosmidgenbanken durch Koloniefilterhybridisierung bei hoher Koloniedichte

Für die Analyse von Cosmidgenbanken durch Koloniefilterhybridisierung wurde die Methode von Hanahan und Meselson (55) in mehreren Punkten modifiziert.
Die Cosmidklone wurden direkt auf Agarplatten etabliert und anschließend auf Membranfilter ("Colony-/Plaque-Screen", NEN Research Products) übertragen (37). Das ursprüngliche Koloniemuster auf der Originalplatte wurde durch Bebrüten (4-6h/37°C) wieder etabliert. Nach der Methode von Hanahan und Meselson (55) wurden insgesamt 3 Replicafilter pro Agarplatte hergestellt, von denen eines bei -20°C als Dauerkultur auf Glyzerinagar (55) aufbewart wurde.

Die Lyse der Kolonien auf den, für die Hybridisierung bestimmten Filtern, sowie die Denaturierung und Fixierung der Cosmid-DNA erfolgte im wesentlichen nach der Vorschrift von Benton und Davis (108).
Die Hybridisierung der Filter mit den radioaktiv markierten Suchklonen (vgl. 4.2.5.) erfolgte wie in 2.2.1. beschrieben. Da eine Zuordnung der primären Hybridisierungssignale zu diskreten Einzelkolonien aufgrund der hohen Koloniedichte in der Regel nicht möglich war, mussten aus ca. $1cm^2$ großen Arealen im Bereich des jeweiligen Hybridisierungssignals die Kolonien entnommen, in LB-Medium supendiert und erneut ausplattiert werden. Von diesen Platten wurden nochmals Replicafilter hergestellt, die mit den jeweiligen Suchklonen hybridisiert wurden. Nach diesem Anreicherungsschritt war dann eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale zu diskreten Einzelkolonien möglich.

4.2.2. Präparation von DNA

4.2.2.1. Präparation von DNA aus Plasmid- und Cosmidklonen

Die Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA erfolgte nach (109) mit einigen Modifikationen (37). Kulturen von Cosmidklonen wurden in der späten log-Phase (OD_{580}=1,2-1,4) geerntet. Als Ausgangsmaterial für Plasmidisolierungen dienten stationäre Kulturen. Plasmide, die kleiner sind als 10 kb, wurden nach Erreichen der mittleren log-Phase (OD_{580}=0,7-0,8) über Nacht mit Chloramphenicol (200µg/ml) amplifiziert.
Die Zellen wurden jeweils nach der NaOH/SDS-Methode (109) lysiert. Nach einem Neutralisationsschritt mit saurem Natriumacetat wurde durch Zentrifugation (11 500 U/min, 1h, Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor) ein klares Lysat gewonnen, aus dem die Plasmid-/Cosmid-DNA durch Zugabe von 0,6 Volumina gefällt wurde. Die DNA wurde dann über 2 Cäsiumchloridgradienten gereinigt.

4.2.2.2. DNA-Präparation aus rekombinanten M13-Phagenklonen

Zur Isolierung von RF-DNA aus M13-Klonen wurden halblogarithmische E coli JM 103 Kulturen (OD_{580}=0,5) mit M13-Phagen infiziert und 5-6h bei 37°C unter starker Belüftung geschüttelt. Die E. coli Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet und wie in 4.2.2.1. beschrieben aufgearbeitet.

4.2.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen; Gelelektrophoresen

Für die zur Kartierung der verschiedenen Klone erforderlichen Restriktionsspaltungen, wurden jeweils 0,5-1µg DNA bei 37°C mit einem 2-4-fachen Überschuß an Restriktionsenzym für 2h inkubiert. Bei der Restriktionsnuklease Sma I wurde die Inkubation bei Raumtemperatur, bei den Nukleasen Taq I und Bst EII bei 60°C durchgeführt.
Bei allen verwendeten Nukleasen mit Ausnahme von Kpn I wurde folgender Puffer verwendet: 0,15mM Spermin; 0,5mM Spermidin; 15mM Tris, pH 7,5; 40 mM KCl; 15mM NaCl; 0,2mM EDTA; 0,2mM EGTA; 7mM ß-Mercaptoethanol. Für Kpn I wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet: 0,01%(v/v) Triton-X-100; 6mM Tris, pH7,6; 6 mM $MgCl_2$; 6mM NaCl; 7mM ß-Mecaptoethanol.

Die erzeugten Restriktionsfragmente wurden dann durch analytische Gelelektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt (110). Für Agarosekonzentrationen unter 0,5% wurde anstelle des Tris-Borat-Puffers (111), Tris-Acetat-Puffer (47) verwendet. Die Gele enthielten 1µg/ml Ethidiumbromid und wurden unter UV-Licht photographiert. Für die Spaltung genomischer menschlicher-DNA aus Zellkulturzellen oder Plazenta wurden jeweils 10-30µg DNA mit 10-60U Restriktionsenzym verdaut und auf 6mm-dicken Vertikalgelen aufgetrennt. Die präparative Auftrennung von Restriktionsfragmenten über 1 kb erfolgte ebenfalls in 6mm-dicken Agarosevertikalgelen.

Hierfür wurde "Sea-Plaque-Agarose" (Marine Colloids Inc., Rockland, Maine) verwendet. Für die Präparation von DNA-Fragmenten unter 1 kb wurden 4mm-dicke Polyacrylamidgele verwendet (4% Polyacrylamid, 1/20 Bis-Acrylamid, Tris-Borat-Puffer); die Elektrophoresen wurden nach (47) durchgeführt.

4.2.4. Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Gelen

Für die Isolierung von Restriktionsfragmenten aus "Sea-Plaque-Agarose" wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und bei 65°C geschmolzen. Die Agarose wurde durch Extraktion mit wassergesättigtem Phenol entfernt. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit Ethanol präzipitiert (112).

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid wurden die Gelstückchen zunächst mechanisch zerkleinert. Dazu wurden sie durch ein Nylonnetz mit enger Maschenweite (80µm; NYHD, Scrynel der Fa. ZBF Rüschlikon, Schweiz) zentrifugiert. Die Geltrümmer wurden dann über Nacht bei 4°C in einer Lösung aus 0,2mM NaCl; 20mM Tris, pH 7,5 und 1mM EDTA inkubiert und anschließend durch Filtration entfernt. Die DNA wurde aus dem Filtrat durch Ethanolfällung gewonnen.

4.2.5. DNA-Transfer auf Nitrozellulosefilter und Hybridisierung

Die in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach der Methode von E.H. Southern (113) auf Nitrozellulosefilter (BA 85, Schleicher & Schüll) transferiert. Der Transfer auf andere feste Matrices ("Gene-Screen" oder "Gene-Screen Plus", NEN Research-Products) erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Filter wurden dann wie in (114) beschrieben, mit den jeweiligen radioaktiven markierten Suchklonen hybridisiert.

4.2.6. Radioaktive Markierung von DNA

Die für Filterhybridisierungen verwendeten Suchklone wurden nach (53, 54) mit [α-^{32}P] dATP und [α-^{32}P] dCTP radioaktiv markiert.

4.2.7. Subklonierung isolierter Restriktionsfragmente in pBR 322

pBR 322-DNA wurde mit Nukleasen gespalten, die kompatible überhängende Enden zu dem subzuklonierenden Restriktionsfragment erzeugen. Die lineare Vektor-DNA wurde anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt (vgl. 4.2.1.1.) und nach zwei Phenolextraktionen ethanolgefällt. Das subzuklonierende Fragment wurde mit der Vektor-DNA in einer nach (107) berechneten Konzentration mit 1U T4 DNA-Ligase über Nacht bei 14°C ligiert. Die auf diese Weise erhaltene rekombinante Plasmid-DNA wurde zur Transformation von E. coli 490A Zellen nach einer Vorschrift von Dagert und Ehrlich (115) eingesetzt.
Die Selektion der Transformanten erfolgte auf L-Agarplatten, denen Ampicillin in einer Konzentration von 100µg/ml zugesetzt war. Von einigen der entstandenen Klone wurden kleine Kulturen in 10ml LB-Medium angezogen. Die DNA der einzelnen Klone wurde nach der Schnellysat-Methode von Birnboim und Doly (109), in einer Modifikation nach (37), isoliert. Diese DNA's wurden durch Spaltung mit Restriktionsenzymen und anschließender Gelelekrophorese auf das Vorhandensein des DNA-Fragments der erwarteten Größe überprüft.

4.2.8. Subklonierung isolierter DNA-Fragmente in M13 mp7, mp8, mp10 und mp18

Rekombinante M13-Phagen wurden mittels geeigneter Restriktionsenzyme wie in 4.2.7. beschrieben konstruiert. Die Transfektion von E. coli JM 103-Bakterien wurde nach Messing et al. (52) durchgeführt. Rekombinante Klone sind bei dieser Methode durch die Ausbildung farbloser Plaques in Anwesenheit des chromogenen Substrats X-Gal zu erkennen.
Die farblosen Plaques wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 5ml einer logarithmisch wachsenden E. coli JM 103-Kultur (OD_{580}=0,5) überführt und 6-7h bei 37°C geschüttelt. Die RF-DNA der rekombinanten Phagen wurde aus den infizierten Bakterienkulturen wie in 4.2.7. beschrieben isoliert und analysiert.

4.2.9. Linker-Addition

Zur Konstruktion des M13-Suchklons m144-2 wurde ein 0,35 kb großes Rsa I-Restriktionsfragment subkloniert. Rsa I erzeugt Fragmente mit glatten Enden. Dieses Fragment wurde mit einem synthetischen Sal I-Linker (Boehringer-Mannheim) versehen, um es in die Sal I-Stelle des Vektors M13 mp7 zu inserieren. Die Linker-DNA wurde dazu zunächst mit Polynukleotidkinase und ATP phosphoryliert (2µg Linker-DNA; 0,5mM ATP; 70mM Tris, pH 7,6; 10mM $MgCl_2$; 10U Polynukleotidkinase, Gesamtvolumen 20µl, Inkubation 1h bei 37°C). Die phosphorylierte Linker-DNA wurde bei hohem molarem Überschuß an das Rsa I-Fragment ligiert. Die überhängenden Sal I-Enden wurden durch anschließende Inkubation mit einem Überschuß an Restriktionsenzym erzeugt.

4.3. Biologische Sicherheit

Alle Klonierungsexperimente wurden entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren" (4. überarbeitete Fassung des Bundesgesundheitsamts, August 1981) unter L2/B1-Bedingungen durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur Organisation menschlicher V-Gensegmente für leichte Immunglobulinketten vom K-Typ. Es wurden menschliche Cosmidgenbanken konstruiert und mit verschiedenen Klonen abgesucht. Zahlreiche Cosmide wurden erhalten und analysiert. Auf diese Weise konnten große Teile des V_K-Locus strukturell charakterisiert werden.

Im Verlauf der Arbeit wurden unter Verwendung von menschlicher Plazenta-DNA drei Cosmidgenbanken etabliert. Dabei wurde ein Konstruktionsprinzip benutzt, durch dessen Anwendung die artifizielle Ligierung genomischer Restriktionsfragmente und die Oligomerisierung von Vektormolekülen weitgehend vermieden werden konnte. Nach einer eingehenden systematischen Analyse von Faktoren, die die Ausbeute an rekombinanten Cosmidklonen beeinflussen, konnten, ausgehend von einer vergleichsweise kleinen Menge an genomischer DNA, Cosmidklone mit hoher Effizienz erhalten werden.
Mit vier verschiedenen Suchklonen für menschliche V_K-Gensegmente wurden insgesamt 100 Cosmidklone aus den Genbanken isoliert. Die Kartierung dieser Klone mit Restriktionsnukleasen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe durchgeführt. Dabei ergaben sich insgesamt 7 chromosomale Regionen (Region A, B, E, L, O, T und W), die durch Gruppen überlappender Cosmide repräsentiert werden.

Zwei dieser Regionen des V_K-Locus (Region W und Region O), wurden über die Restriktionskartierung hinaus näher analysiert. Anschließend wurden aus terminalen Bereichen beider Strukturen spezifische Subklone konstruiert, die zur Isolierung von extendierenden Cosmidklonen aus Genbanken verwendet wurden ("chromosomal walking"). Auf diese Weise war es möglich, die beiden genannten Regionen auf eine Größe von jeweils etwa 100 kb auszudehnen.

ie Region W (dargestellt in Abb. 14, S. 59) setzt sich aus zwei solierten, strukturell außerordentlich homologen Teilregionen Region Wa und Wb) zusammen. Durch Analyse der DNA von 17 nicht erwandten menschlichen Individuen mit einem Suchklon, der einen nterschied in einer Restriktionsspaltstelle zwischen den Regio- en Wa und Wb spezifisch erkennt, konnte bewiesen werden, daß eide Teilregionen an verschiedenen Positionen innerhalb des V_K- ocus angeordnet sind. Die Homologie beider Strukturen kann also icht durch das Vorliegen unterschiedlicher Allele erklärt wer- en, sondern ist auf ein Duplikationsereignis während der Evo- ution zurückzuführen. Aus den vorliegenden Restriktionskarten ann man ersehen, daß ein Bereich von mindestens 50 kb dupliziert orliegt. Hinweise darauf, daß nicht der gesamte V_K-Locus dupli- iert vorliegt, wurden vor allem bei der Isolierung von exten- ierenden Cosmidklonen erhalten: Die Extensionssuchklone, die aus en terminalen Bereichen der Regionen Wa und Wb konstruiert urden, erkennen offenbar keine homologe Struktur in der jeweils nderen Teilregion. Dies wird aus der Analyse von insgesamt 31 osmidklonen gefolgert, die mit den Suchklonen isoliert worden aren.

ei der Extension der Region O (dargestellt in Abb. 17, S. 68) in '-Richtung wurde eine komplexe Situation gefunden, die mö- licherweise ebenfalls auf das gleichzeitige Vorkommen dupli- ierter und nicht-duplizierter Strukturen zurückzuführen ist. Mit inem Suchklon, der aus einem in duplizierter Form isolierten nteil der Region O konstruiert worden war, wurden extendierende osmidklone erhalten, deren Restriktionskarten im überlappenden eil mit der Ausgangssituation übereinstimmen. Im extendierenden eil divergieren beide Strukturen. Durch die Kartierung von osmidklonen aus diesem Bereich konnten also zwei unterschied- iche Regionen charakterisiert werden (Region Oa und Ob), deren '-Anteile stark homolog sind, und deren 3'-Anteile keinerlei omologie aufweisen.
ie Abstände der V-Gensegmente innerhalb der charakterisierten trukturen variieren zwischen 1 kb und 15 kb. Im 3'-Teil der egion Wa konnten über eine Distanz von ca. 80 kb keine V-Gen- egmente nachgewiesen werden. Ein ähnliches Bild wurde für den

3'-terminalen Bereich der Region Ob erhalten. Auf dem derzeitigen Stand der Analyse kann nicht entschieden werden, ob es sich dabei um größere intergenische Abschnitte oder um die Randbereiche des V_K-Locus handelt.

Durch Hybridisierungsversuche konnte gezeigt werden, daß die untersuchten V-Gensegmente innerhalb der Regionen Wa und Wb in gleicher 5'-3' Orientierung angeordnet sind. Dieser Befund ist im Zusammenhang mit den derzeit diskutierten Mechanismen der V-J-Umlagerung interessant.

Innerhalb der untersuchten Regionen konnten jeweils V-Gensegmente verschiedener Subgruppen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß die V_K-Multigenfamilie nicht allein durch Amplifikation von Ur-V_KI, -V_KII und -V_KIII-Genen entstanden sein kann. Zusätzlich muß man Transpositionsereignisse annehmen, die zu einer Vermischung der Subgruppen und damit zum heutigen Bild des V_K-Locus geführt haben.
Die Frage nach der Zahl von V_K-Gensegmenten kann endgültig erst dann beantwortet werden, wenn eine zusammenhängende Genkarte des gesamten V_K-Locus erstellt ist. Durch die Analyse von Cosmidklonen innerhalb der Arbeitsgruppe konnten in einem Gesamtbereich von über 1000 kb bisher 75-80 verschiedene menschliche V_K-Gensegmente nachgewiesen werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Cosmidgenbanken sowie die Isolierung und Charakterisierung einer großen Anzahl rekombinanter Klone, lieferten die Grundlage für einen detaillierten Einblick in die komplexe Struktur der V_K-Multigenfamilie.

6. Literaturverzeichnis

1. S. Tonegawa, Nature **302**, 575-581 (1983)

2. L.E. Hood, I.L. Weissman, W.B. Wood und J.H. Wilson, Immunology, 2. Edition, Benjamin Cummings (1984)

3. R.R. Porter, Biochem. J. **73**, 119-127 (1959)

4. G.M. Edelman, J. Am. Chem. Soc. **81**, 3155-3161 (1959)

5. N. Hilschmann und L.C. Craig, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **53**, 1403-1409 (1965)

6. C. Milstein, Nature **216**, 330-332 (1967)

7. N. Hozumi und S. Tonegawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 3628-3632 (1976)

8. R. Lenhard-Schuller, B. Hohn, C. Brack, M. Hirama und S. Tonegawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 4709-4713 (1978)

9. J.G. Seidman und P. Leder, Nature **276**, 790-794 (1978)

10. C. Brack, M. Hirama, R. Lenhard-Schuller und S. Tonegawa, Cell **15**, 1-14 (1978)

11. P. Early, H. Huang, M.Davis, K. Calame und L.E. Hood, Cell **19**, 981-986 (1980)

12. F. Alt und D. Baltimore, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4118-4122 (1982)

13. T. Honjo und S. Habu, Ann. Rev. Biochem. **54**, 803-830 (1985)

14. B.W. Elliot, H.N. Eisen und L. Steiner, Nature **299**, 559-561 (1982)

15. M. Nishi, T. Kataoka und T. Honjo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 6399-6403 (1985)

16. E.E. Max, J.G. Seidman und P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 3450-3454 (1979)

17. H. Sakano, K. Huppi, G. Heinrich und S. Tonegawa, Nature **280**, 288-294 (1979)

18. E.P. Zeelon, A.L.M. Bothwell, F. Kantor und I. Schechter, Nucl. Acids Res. **9**, 3809-3820 (1981)

19. S. Cory, B.M. Tyler und J.M. Adams, J. Mol. Appl. Genet. **1**, 103-116 (1981)

20. H.R. Jaenichen, M. Pech, W. Lindenmaier, N. Wildgruber und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. **12**, 5249-5263 (1984)

21. G. Rechavi, B. Bienz, D. Ram, Y. Ben-Neriah, J.B. Cohen, R. Zakut und D. Givol, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4405-4409 (1982)

22. C.-A. Reynaud, V. Anques, A. Dahan und J.-C. Weill, Cell **40**, 283-291 (1985)

23. C. Milstein, Nature **205**, 1171-1173 (1965)

24. E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilowsky, M. Reid-Miller und H. Perry, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983), U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda

25. C. Milstein, Nature **216**, 330-332 (1967)

26. A.C. Wang, H.H. Fudenberg, J.V. Wells und D. Roelcke, Nature New Biol. **243**, 126-127 (1973)

27. M. Weigert und R. Riblet, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **41**, 837-847 (1976)

28. D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, Cell **24**, 613-623 (1981)

29. R.M. Lawn, E.F. Fritsch, R.C. Parker, G.B. Blake und T. Maniatis, Cell **15**, 1157-1174 (1978)

30. W. Lindenmaier, H. Hauser, J. Greiser de Wilke und G. Schütz, Nucl. Acids Res. **10**, 1243-1253 (1982)

31. J. Collins und H.J. Brüning, Gene **4**, 85-107 (1978)

32. J. Collins und B. Hohn, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 4242-4246 (1979)

33. B. Hohn, J. Mol. Biol. **92**, 93-106 (1975)

34. N. Sternberg, D. Tiemeier und L. Enquist, Gene **1**, 255-280 (1977)

35. D. Hanahan, J. Mol. Biol. **166**, 557-580 (1983)

36. F.G. Grosveld, H.H.M. Dahl, E. DeBoer und R.A. Flavell, Gene **13**, 227-237 (1981)

37. D. Ish-Horowicz und J.F. Burke, Nucl. Acids Res. **9**, 2989-2998 (1981)

38. A.R. Wyman, L.B. Wolfe und D. Botstein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 2880-2884 (1985)

39. D.R.F. Leach und F. Stahl, Nature **305**, 448-451 (1983)

40. N. Arnheim und M. Kuehn, J. Mol. Biol. **134**, 743-755 (1979)

41. M. Steinmetz, A. Winoto, K. Minard und L.E. Hood, Cell **28**, 489-498 (1982)

42. E.H. Weiss, L. Golden, K. Fahrner, A.L. Mellor, J.J. Devlin, H. Bullman, H. Tiddens, H. Bud und R.A. Flavell, Nature **310**, 650-655 (1984)

43. J. Gitschier, W.I. Wood, T.M. Gorolka, K.L. Wion, E.Y. Chen, D.H. Eaton, G.A. Wehar, D.J. Capon und R.M. Lawn, Nature **312**, 326-330 (1984)

44. M. Pech, H.-R. Jaenichen, H.-D. Pohlenz, P.S. Neumaier, H.G. Klobeck und H.G. Zachau, J. Mol. Biol. **176**, 189-204 (1984)

45. W. Chia, M.R.D. Scott und P.W.J. Rigby, Nucl. Acids Res. **10**, 2503-2520 (1982)

46. H. Suback-Sharpe, R.R. Brück, L.V. Crawford, J.R. Morrison, J. Hay und H.M. Keir, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **31**, 737-748 (1966)

47. T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular cloning", Cold Spring Harbor Laboratory (1982)

48. F. Bolivar und K. Backman, Methods Enzym. **68**, 245-269 (1979)

49. B. Low, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **60**, 160-164 (1968)

50. P. Leder, D. Tiemeier und L. Enquist, Science **196**, 175-177 (1977)

51. B. Straubinger, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München

52. J. Messing, Methods Enzymol. **101**, 20-78 (1983)

53. T. Maniatis, A. Jeffrey und D. Kleid, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 1184-1188 (1975)

54. P.W.J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes und P. Berg, J. Mol. Biol. **113**, 237-251 (1977)

55. D. Hanahan und M. Meselson, Methods Enzym. **100**, 333-342 (1983)

56. B. Straubinger, M. Pech, K. Mühlebach, H.R. Jaenichen, H.G. Bauer und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. **12**, 5265-5275 (1984)

57. M. Pech, H. Smola, H.-D. Pohlenz, B. Straubinger, R. Gerl und H.G. Zachau, J. Mol. Biol. **183**, 291-298 (1985)

58. H.G. Bauer, Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München (1986)

59. E. Lötscher, K.-H. Grzeschik, H.G. Bauer, H.-D. Pohlenz, B. Straubinger und H.G. Zachau, Nature **320**, 456-458 (1986)

60. H.G. Klobeck, A. Solomon und H.G. Zachau, Nature **309**, 73-76 (1984)

61. E. Huber, Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München

62. H.G. Klobeck, G.W. Bornkamm, G. Combriato, R. Mocikat, H.-D. Pohlenz und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. **13**, 6514-6526 (1985)

63. M. Pech und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. **12**, 9229-9236 (1984)

64. H. Smola, Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität München

65. H.G. Klobeck, A. Meindl, G. Combriato, A. Solomon und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. **13**, 6499-6513 (1985)

66. L. Clarke und J. Carbon, Cell 9, 91-99 (1976)

67. B. Seed, R.C. Parker und N. Davidson, Gene **19**, 201-209 (1982)

68. D. Denhardt, Biochem. Biophys. Res. Commun. **23**, 641-646 (1966)

69. H.O. Smith und M.L. Birnstiel, Nucl. Acids Res. **3**, 2387-2389 (1976)

70. F.J. Zimmer, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München

71. E. Lötscher, Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München

72. W. Lorenz, Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München

73. J. Stavnezer, O. Kekisch, D. Batter. I. Balazs, E. Henderson und B.J.M. Zegers, Nucl. Acids Res. **13**, 3495-3514 (1985)

74. M. Cochet, F. Gannon, R. Iten, L. Maroteaux, F. Perrin und P. Chambon, Nature **282**, 567-574 (1979)

75. S. Lewis, N. Rosenberg, F. Alt und D. Baltimore, Cell **30**, 807-816 (1982)

76. D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, Cell 32, 181-189 (1983)

77. A. Meindl, Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München

78. W. Bender, P. Spierer und D.S. Hogness, J. Mol. Biol. **168**, 17-33 (1983)

79. D.C. Schwarz und C.R. Cantor, Cell **37**, 67-75 (1984)

80. G.F. Carle und M.V. Olson, Nucl. Acids Res. **12**, 5647-5664 (1984)

81. F.S. Collins und S.M. Weissman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 6812-6816 (1984)

82. R. Catteneo, J. Gorski und B. Mach, Nucl. Acids Res. **9**, 2777-2790 (1981)

83. K. Henco, J. Brosius, A. Fujisawa, J.-I. Fujisawa, J.R. Haynes, J. Hochstadt, T. Kovacic, M. Pasek, A. Schamböck, J. Schmid, K. Todokaro, M. Wälchli, S. Nagata und C. Weissmann, J. Mol. Biol. **185**, 227-260 (1985)

84. M. Steinmetz, W. Altenburger und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. **8**, 1709-1720 (1980)

85. S. Tonegawa, N. Hozumi, G. Matthyssen und R. Schuller, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol **41**, 877-890 (1977)

86. J. Höchtl, C.R. Müller und H.G. Zachau, Poc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 262-266 (1982)

87. B.G. van Ness, C. Coleclough, R.P. Perry und M. Weigert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 262-266 (1982)

88. J. Höchtl und H.G. Zachau, Nature **302**, 260-263 (1983)

89. S. Lewis, A. Gifford und D. Baltimore, Nature **308**, 425-428 (1984)

90. L. Hood, J.H. Campbell und S.C.R. Elgin, Ann. Rev. Genet. **9**, 305-353 (1975)

91. R. Mocikat, Manuskript in Vorbereitung

92. D.J. Kemp, S. Cory und J.M. Adams, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4627-4631 (1979)

93. D.J. Kemp, B.Tyler, O. Bernard, N. Gough, S. Gerondakis, J.M. Adams und S. Cory, J. Mol. Appl. Genet. **1**, 245-261 (1981)

94. G. Heinrich, A. Traunecker und S. Tonegawa, J. exp. Med. **159**, 417-435 (1984)

95. D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, Nature **288**, 730-733 (1980)

96. D.L. Bentley, Nature **307**, 77-80 (1984)

97. R. Menervi, A. Agresti, G. Della Valle, D. Talarico, A.G. Siccardi und E. Ginelli, J. Mol. Biol. **186**, 483-489 (1985)

98. P. Leder, D. Tiemeier und L. Enquist, Science **196**, 175-177 (1977)

99. B. Hohn und K. Murray, Proc. Natl. Acad. Sci. **74**, 3259-3263 (1977)

100. B. Hohn und J. Collins, Gene **11**, 291-298 (1980)

101. F. Bolivar, R.L. Rodrigues, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa und S. Falkow, Gene **2**, 95-113 (1977)

102. N. Blin und D.W. Stafford, Nucl. Acids Res. **3**, 2303-2308 (1976)

103. J. Norander, T. Kempe und J. Messing, Gene **26**, 101-106 (1983)

104. C.P. Lin, P.W. Tucker, J.F. Mushinski und F.R. Blattner, Science **209**, 1348-1353 (1980)

105. F. Scalenghe, E. Turco, J.E. Edström, V. Pirotta und F. Melli, Chromosoma **82**, 205-216 (1981)

106. E.M. Meyerowitz, G.M. Guild, L.S. Prestidge und D.S. Hogness, Gene **11**, 271-282 (1980)

107. A. Dugaiczyk, H.W. Boyer und H.M. Goodman, J. Mol. Biol. **96**, 171-184 (1975)

108. W.D. Benton und R.W. Davis, Science **196**, 180-182 (1977)

109. H.C. Birnboim und J. Doly, Nucl. Acids Res. **7**, 1513-1523 (1979)

110. C. Aaij und P. Borst, Biochim. Biophs. Acta **269**, 192-200 (1972)

111. A.C. Peacock und C.W. Dingman, Biochemistry **6**, 1818-1827 (1967)

112. J. Gafner, E.M. de Robertis und P. Philippsen, EMBO J. **2**, 583-591 (1983)

113. E.M. Southern, J. Mol. Biol. **98**, 503-517 (1975)

114. H. Schnell, M. Steinmetz, H.G. Zachau und I. Schechter, Nature **286**, 170-173 (1980)

115. M. Dagert und S.D. Ehrlich, Gene **6**, 23-28 (1979)

116. H.O. Smith und D. Nathans, J. Mol. Biol. **81**, 419-423 (1973)

117. "Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents", Eur. J. Biochem. **15**, 203-208 (1970)

118. "Abbreviations and Symbols", Eur. J. Biochem. **74**, 1-6 (1977)

7. Abkürzungen und Erklärungen

bp	Basenpaare
kb	Kilobasenpaare (=1000 bp)
OD	optische Dichte
pfu	Plaque bildende Einheiten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat (150mM NaCl, 15mM Natriumcitrat, pH=7,0)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
C	konstante Region von leichten und schweren Ketten
CDR	"complementarity determining region": variable Region der leichten und schweren Ketten, die mit dem Antigen in Wechselwirkung tritt
D	"diversity-Segment": Gensegment, das die Diversität der variablen Regionen schwerer Ketten erhöht
FR	"framework region": Region, die die konstanten Bereiche der variablen Regionen von leichten und schweren Ketten bestimmt
H-Kette	schwere Kette der Antikörper
J	"joining segment": Gensegment, an das die V-Gensegmente der leichten Ketten umgelagert werden
L-Kette	leichte Kette der Antikörper
V	variable Region der Immunglobuline
V_H, V_L	variable Region der Immunglobuline des schweren (leichten) Kettentyps
V_K, V_λ	variable Region der K-(λ) Kette

Regionen des V_K-Locus, die über Restriktionskarten überlappender Cosmidklone definiert sind, werden durch Buchstaben gekennzeichnet:

Region Aa und Ab (siehe Kapitel 2.2.2. und Zitat (51))
Region B (siehe Kapitel 2.3.4. und Zitat (62))
Region E (siehe Kapitel 2.2.2. und Zitate (51, 71, 72))
Region La und Lb (siehe Kapitel 2.2.2. und Zitate (44, 57, 63))
Region Oa und Ob (siehe Kapitel 2.3.2., 2.4.6. und 2.6.)
Region T (siehe Kapitel 2.3.5. und Zitat (70))
Region Wa und Wb (siehe Kapitel 2.3.1., 2.4.3. und 2.5.)

V_K-Gensegmente, die in rekombinanten Cosmidklonen enthalten sind werden durch Zahlen und Großbuchstaben gekennzeichnet (z.B.: W4 ist ein V-Gensegment der W-Region).

Cosmidklone werden wie folgt gekennzeichnet:

cos 100ff: Cosmidklone, die aus den Genbanken IIIa, b, c isoliert wurden
cos 500ff Cosmidklone, die aus der Genbank IVb isoliert wurden
cos 650ff Cosmidklone, die aus der Genbank IVa isoliert wurden

Subklone werden durch Kleinbuchstaben und Zahlen gekennzeichnet: z.B. ist m143-1 ein M13-Subklon aus cos 143 (m steht für M13-Phagenklon); p166-2 ist ein Subklon aus cos 166 im Plasmidvektor pBR 322 (p steht für Plasmid). Die Bezeichnung der Subklone aus umgelagerten Genregionen erfolgt nach (60, 62, 65).

Die Bezeichnungen für Restriktionsnukleasen entsprechen den in (116) gegebenen Empfehlungen. Die anderen Angaben entsprechen den Empfehlungen der "IUPAC-IUB Comission on Biochemical Nomenclature", die in (117) und (118) beschrieben sind.

In Abbildungen werden folgende Symbole für Restriktionsnukleasen verwendet:

Ac=Acc I, Av=Ava I, Bm=Bam HI, Bg=Bgl II, Bs=Bst EII, Cl=ClaI, Ec=Eco RI, Ev=Eco RV, Hp=Hpa I, Ha=Hpa II, HII=Hind II, HIII=Hind III, Hf=Hinf I, Kp=Kpn I, Nr=Nru I, Ps=Pst I, Pv=Pvu I, PII=Pvu II, Rs=Rsa I, Sc=Sac I, Sl=Sal I, Su=Sau 3A, Sa=ScaI, Sm=Sma I, Sp=Sph I, St=Stu I, Tq=Taq I, Xb=Xba I, Xh=XhoI.

LEBENSLAUF

Am 11. Juli 1953 wurde ich in Stuttgart geboren. Von 1961-1964 besuchte ich die Volksschule in Bernhausen (Baden-Württemberg), von der ich 1964 auf das Paracelsus-Gymnasium in Stuttgart-Hohenheim überwechselte. Nach der Reifeprüfung im Jahre 1973, leistete ich von Juli 1973 bis September 1974 meinen Grundwehrdienst ab. Im Sommersemester 1975 begann ich das Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Im Wintersemester 1977 wechselte ich in das Fach Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen über. Von 1979 bis 1980 studierte ich Chemie und Biochemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nach der Diplomprüfung in Biochemie im Jahre 1981 in Tübingen, fertigte ich am Institut für Botanik der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Oberwinkler meine Diplomarbeit mit dem Thema "Untersuchungen zur Organisation und Primärstruktur mitochondrialer tRNA-Gene in Oenothera Villaricae" in der Zeit von Januar 1982 bis September 1982 an.

Seit Oktober 1982 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. H.G. Zachau am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München an der vorliegenden Dissertation.
Seit Januar 1985 bin ich mit meiner Frau Carmen geb. Ruh verheiratet und habe zwei Kinder.